

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA TEXTILNÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ

Studijní program: N3106 Textilní inženýrství

Studijní obor: Textilní materiálové inženýrství

Katedra: Katedra netkaných textilií

Příprava podpůrných tkáňových struktur z funkcionalizovaných biopolymerů

Preparation of scaffolds from functionalized biopolymers

Autorka: Miroslava Rysová, Bc.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Lenka Martinová, CSc.

Počet stran textu: 100

Počet obrázků: 27

Počet tabulek: 14

Počet příloh: 10

Zadání

P r o h l á š e n í

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

V Liberci dne 9. května 2012.

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala všem členům akademické obce Technické univerzity v Liberci, kteří se nějakým způsobem podíleli na experimentech této diplomové práce nebo jinak přispěli k jejímu úspěšnému dokončení.

Samozřejmě chci vyjádřit vděk svým rodičům a sourozencům za podporu, kterou mi poskytli, a také mému příteli a lásce, který po celou dobu práce stál při mně, podporoval mě a věřil.

V neposlední řadě chci a musím poděkovat své vedoucí za její pomoc, podporu a pochopení a nesmírnou trpělivost, kterou se mnou měla a bez které by tato práce asi nikdy nebyla dokončena.

Anotace

Tato práce se zabývá možnostmi tvorby nanovláknenných struktur pro tkáňové inženýrství (TI), požadavky kladené v tomto oboru na používané materiály a podpůrné struktury. Dále jsou zde zmíněny možnosti funkcionalizace materiálů pro TI, vysvětlen princip elektrostatického zvlákňování a vliv proměnných na tento proces a výslednou nanovláknennou vrstvu. Součástí první části je také úvod do teorie polymerních směsí a krátká rešerše týkající se jejich aplikace pro elektrostatické zvlákňování s ohledem na další využití v tkáňovém inženýrství.

Druhá, tedy experimentální část je rozdělena do tří oddílů. Ty se zabývají možnostmi tvorby nanovláknenných struktur z funkcionalizovaných biopolymerů metodou (A) elektrostatického zvlákňování polymerních směsí a (B) roubováním na polymerních řetězcích na povrch nanovláken a ověřováním účinností těchto postupů. Pro postupy (A), (B) je využívána kombinace syntetického a přírodního biopolymeru – poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) a kolagenu (K) typu I. Třetí část (C) se zabývá testováním proliferace buněk MG-63 na vytvořených funkcionalizovaných strukturách.

Klíčová slova

Tkáňové inženýrství, scaffold, elektrostatické zvlákňování, funkcionalizace, polymerní směs, polymerační roubování, poly- ϵ -kaprolakton, kolagen.

Annotation

This graduate thesis deals with possibilities of tissue engineering scaffolds from functionalized biopolymers. The first part gives explanations about the Tissue engineering and (TE) and requirements scaffolds. In the first part, there are also mentioned possibilities of material functionalization for the TE, and the principle of electrostatic spinning and effects of its parameters are explained too. The first part of this diploma thesis also gives a short introduction to the polymer blend theory and their application in electrostatic spinning according to the further application in the field of tissue engineering.

The second (experimental) part of this work is divided into the three parts. These parts deal with nanofibrous biopolymer functionalized scaffolds manufacturing. Via (A) blend electrospinning and (B) surface graft polymerization. Effectiveness of these methods is also evaluated. Methods (A) and (B) use combination of synthetic and natural biopolymers – poly- ϵ -caprolactone (PCL) and collagen type I (K). Part (C) is dedicated to in vitro testing of functionalized nanovifres.

Key words

Tissue engineering, scaffold, electrostatic spinning, functionalization, polymer blend, surface graft polymerization, poly- ϵ -caprolactone (PCL), collagen.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina octová
ALP	alkalická fosfatáza
apod.	a podobně
atd.	a tak dále
CS	chitosan
DMSO	dimethylsulfoxid
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
El-spinn	elektrostatické zvlákňování
FTIR	Fourierova transformační infračervená spektroskopie
G	želatina
H	enthalpie
K (1, 2)	kolagen
Mw(n)	molekulová hmotnost
NaCl	chlorid sodný
-NH ₂	aminová skupina
OC	osteokalcin
OH-	hydroxylová skupina
PAL	povrchově aktivní látka
PCL	poly-ε-kaprolakton
PEO	polyethylenoxid
PGA	kyselina polyglykolová
pKa	disociační konstanta
PLA	kyselina polymléčná
RH	relativní vlhkost ovzduší (%)
S	entropie
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
Tg(m,n)	teplota zesklňování (tání, nukleace) [°C]
THF	tetrahydrofuran
TPU	termoplastický polyuretan
Xc	krystalinita [%]
γ	povrchové napětí [mN/m]
ρ	hustota [kg/m ³]
λ	vlnočet [cm ⁻¹]

Obsah

TEORETICKÁ ČÁST	13
1 Tkáňové inženýrství	13
1.1 Nosné struktury pro TI	14
1.1.1 Materiály	14
1.1.2 Metody tvorby scaffoldů pro TI	16
1.1.2.1 Pojení vláken	17
1.1.2.2 Odpar rozpouštědla a vymývání částic	17
1.1.2.3 Zpěňování (Gas foaming)	18
1.1.2.4 Vymrazování (Freeze drying – sušení mrazem)	18
1.1.2.5 Fázová separace	18
1.1.2.6 Zpracování bez pevné formy (SFF, Solid freeform fabrication)	19
1.1.2.7 Příprava hydrogelů	19
1.1.2.8 Další metody	20
2 Elektrostatické zvlákňování (El-spin)	21
2.1 Podstata procesu a aparatura	21
2.2 Parametry ovlivňující proces	22
2.2.1 Procesní parametry	22
2.2.1.1 Intenzita elektrického pole	23
2.2.1.2 Průtok polymeru	23
2.2.1.3 Geometrie zařízení	23
2.2.1.4 Parametry prostředí	23
2.2.2 Systémové parametry	24
2.2.2.1 Systémové vlastnosti polymeru	24
2.2.2.2 Systémové vlastnosti roztoku	25
Koncentrace roztoku	25
Povrchové napětí	25
Vodivost roztoku	25
Volba rozpouštědla	26
2.3 Vlastnosti nanovláken	26
2.4 Využití nanovláken v tkáňovém inženýrství	27
3 Biopolymery	31
3.1 Roztoky biopolymerů	34
3.1.1 Rozpouštědla	34

3.1.2	Polyelektrolyty	35
3.1.2.1	Roztoky vysokomolekulárních neelektrolytu	35
	Zředěné roztoky neelektrolytů	35
	Koncentrované roztoky neelektrolytů	36
3.1.2.2	Roztoky polyelektrolytu	36
	Zředěné roztoky polyelektrolytů	36
	Koncentrované roztoky polyelektrolytů	37
3.1.3	Elektrostatické zvlákňování biopolymerů Chyba! Záložka není definována.	
3.1.3.1	Kolagen a jeho zvlákňování..... Chyba! Záložka není definována.	
3.1.3.2	Želatina a její zvlákňování	Chyba! Záložka není definována.
3.1.3.3	Nanovlákná z celulosy a jejích derivátů Chyba! Záložka není definována.	
3.1.3.4	Chitin, chitosan a jejich zvlákňování	Chyba! Záložka není definována.
3.1.3.5	Nanovlákná ze syntetických biopolymerů .. Chyba! Záložka není definována.	
	3.1.3.5.1 Kyseliny polymléčná, polyglykolová a jejich kopolymerů .. Chyba! Záložka není definována.	
	3.1.3.5.2 Nanovlákná z poly-(ε-kaprolaktonu)..... Chyba! Záložka není definována.	
4	Další metody získávání funkcionalizovaných nanovláknenných útvarů... Chyba! Záložka není definována.	
4.1	Úprava plazmou..... Chyba! Záložka není definována.	
4.2	Mokrý chemický úpravy	Chyba! Záložka není definována.
4.3	Polymerační roubování (grafit polymerization)	Chyba! Záložka není definována.
5	Shrnutí tezí teoretické části	49
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	50
6	Cíle experimentu	50
7	Materiály.....	52
7.1	Poly-ε-kaprolakton (PCL).....	52
7.2	Kolagen.....	53
	Kolagen K1	53
	Kolagen K2.....	53
7.3	Rozpouštědla	53
8	Použitá zařízení.....	54
8.1	Tyčková aparatura	54
8.2	Vakuová plazmatická aparatura.....	55
8.3	Měření povrchového napětí roztoků	56

8.4	Měření pH.....	56
8.5	Elektronová mikroskopie a zpracování vzorků.....	56
8.6	Fourierova transformační infračervená spektroskopie (FTIR).....	57
8.7	Diferenciální skenovací analýza (DSC).....	57
A.	Elektrostatické zvlákňování polymerních směsí.....	59
8.8	Příprava roztoků	59
8.9	Mísení roztoků	60
	Diskuze výsledků.....	61
8.10	Zvlákňování roztoků biopolymerů.....	63
8.10.1	Zvlákňování homopolymerních roztoků	63
8.10.1.1	Kolagen (K)	63
	Diskuze výsledků.....	63
8.10.1.2	Poly-ε-kaprolakton (PCL).....	64
	Diskuze výsledků.....	64
8.10.2	Zvlákňování roztoků směsí biopolymerů.....	65
	Diskuze výsledků.....	65
	Vliv koncentrace kyseliny octové (AA).....	67
	Vliv koncentrace kolagenu v roztoku	67
	Vliv poměru složek (PCL/K).....	67
8.11	Funkcionalizované nanovláknenné vrstvy	68
8.11.1	Morfologie nanovláknenných vrstev	68
8.11.2	Vliv rozpouštědel a jejich koncentrací.....	69
	Diskuze výsledků	70
8.11.3	Vliv podílu kolagenu	70
	Diskuze výsledků	72
8.11.4	Vliv stárnutí roztoku	73
	Diskuze výsledků	73
8.11.5	Vliv procesních podmínek	73
	Diskuze výsledků	74
8.11.6	Chemické složení funkcionalizovaných nanovláken	75
	Diskuze výsledků.....	76
8.11.7	Krystalinita funkcionalizovaných nanovláken	77
8.11.7.1	Vliv elektrostatického zvlákňování na krystalinitu	78
	Diskuze výsledků.....	79

8.11.7.2	Vliv podílu kolagenu na krystalinitu nanovláken.....	81
	Diskuze výsledků.....	82
8.11.7.3	Mísitelnost polymerů	83
	Diskuze výsledků.....	83
8.12	Závěry kapitoly A	84
B.	Povrchová funkcionalizace	85
8.13	Příprava vzorků.....	85
8.13.1	Příprava substrátu	85
8.13.2	Podmínky plazmatické iniciace	86
8.13.3	Podmínky smáčení.....	87
8.14	Funkcionalizované vrstvy	87
8.14.1	Struktura funkcionalizovaných vrstev	89
	Diskuze výsledků.....	89
8.14.2	Účinnost funkcionalizace.....	89
	Diskuze výsledků.....	90
	Vliv reakčního plynu	90
	Vliv koncentrace smáčecího roztoku.....	90
	Vliv doby smáčení.....	92
8.15	Závěry kapitoly B	93
C.	Testy tkáňového růstu	94
8.16	Testované vzorky.....	94
8.17	Příprava vzorků pro testy	96
8.18	Testování - kultivace buněk.....	96
	Diskuze výsledků.....	97
	Proliferace buněk.....	99
	Morfologie buněk	103
	Imunofluorescence vzorků.....	103
8.19	Závěry kapitoly C	105
Závěr	107
Použití zdroje	109
PŘÍLOHOVÁ ČÁST	119

Úvod

Nanovlákná v současné době představují materiál s velkým potenciálem pro řadu aplikací. Jednou ze stále se rozvíjejících oblastí jejich aplikace je medicína a nanomateriály zde mohou být využity pro hojení ran, dopravu léčiva a tkáňové inženýrství. Jejich využití právě v tomto oboru poskytuje řadu výhod a zároveň s sebou nese specifické požadavky na vlastnosti materiálu. Ty řídí interakce mezi povrchem scaffoldu a biologickým (buněčným) materiálem a z těchto důvodů jsou kladeny požadavky na hydrofilnost, biokompatibilitu, buněčnou adhezi atd. V případě, že se zmíněných vlastností danému materiálu nedostává, případně nejsou-li dostačující danému účelu, je možné na materiál aplikovat tzv. funkcionalizaci a dosáhnout tím zlepšení požadovaných vlastností. Funkcionalizace obecně umožňuje zvýšení funkční hodnoty materiálu pro danou aplikaci. V případě tkáňového inženýrství se jedná o zavedení funkčních skupin na povrch materiálu (*Cheng and Teoh, 2004*) a tím zlepšení adheze a proliferace buněk na něm. Je však nutné zmínit, že každý typ buňky je v těchto požadavcích na povrch scaffoldu značně specifický (*Liao et al. 2008*) a metoda i materiál funkcionalizace mají být voleny na tomto základě. V současné praxi se využívá zejména funkcionalizace nanovláken ze syntetických polymerů. Jejich užití přináší dobré mechanické vlastnosti a snazší zpracování metodou elektrostatického zvláknování, avšak jsou nedostačující z hlediska biologické aktivity (*Yoo et al, 2009*). Z tohoto důvodu jsou v jejich hmotě či na povrchu kovalentně či fyzikálně imobilizovány funkční skupiny či molekuly s požadovanými vlastnostmi. K tomuto účelu jsou v současné době velice často využívány přírodní biopolymery – proteiny, polysacharidy atd. (*Yoo, et al, 2009*).

Materiálem velice zajímavým pro tkáňové inženýrství je kolagen. Jeho využití v tomto oboru je však do jisté míry omezeno jeho mechanickými vlastnostmi a tím vyvolanou nutností síťování. Řešením, které umožní získání nanovláknenných struktur s obsahem kolagenu bez síťování (bez použití toxických síťovadel), je právě funkcionalizace. Její využití v kombinaci s vhodným doprovodným materiálem poskytujícím nezbytné vlastnosti (mechanickou pevnost, snadné zpracování) umožňuje získat funkční materiály požadované struktury a chemismu povrchu. Nutnou

podmínkou je využití vhodných doprovodných chemikálií a rozpouštědel, jež nebudou negativně ovlivňovat biokompatibilitu materiálu.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství (TI) je relativně mladý, ale intenzivně se rozvíjející obor, který v současné době představuje hlavní odvětví regenerativní medicíny. K rychlému rozvoji tohoto interdisciplinárního oboru došlo zejména díky rozvoji na poli materiálového inženýrství a také v oblasti výzkumu kmenových buněk. Tyto dvě disciplíny umožnily od roku 1998 nebývalý rozvoj tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny vůbec. (*Auger and Germain, 2008*)

Termín tkáňového inženýrství byl poprvé definován na sjezdu americké Národní vědecké společnosti (National Science Foundation; NSF) v roce 1988 jako „*aplikace principů a metod inženýrství a přírodních věd (life sciences) za účelem porozumění vztahu struktury a funkce v normálních a patologických tkáních savců a k vývoji biologických náhrad pro obnovu, regeneraci a rekonstrukci, udržení či vylepšení tkání popř. orgánových funkcí*“. (*Eberli, 2010*)

Základní princip tkáňového inženýrství předestřený touto definicí tedy spočívá v (1) získání buněk prostřednictvím tkáňové biopsie, (2) rozšíření těchto buněk v buněčnou kulturu, (3) osazení materiálu scaffoldu buněčnou kulturou a (4) její kultivace na scaffoldu in vitro za účelem získání struktury živé tkáně před samotnou (5) implantací do organismu příjemce. Zásadní výhodou implantace takového in vitro vypěstovaného autologního konstruktu je minimalizace nebo naprostá eliminace imunogenicity a odmítavých reakcí, ke kterým dochází u alogenních a xenogenních implantací. (*Eberli, 2010*)

Základními stavebními kameny tkáňového inženýrství je tzv. triáda TI, která sestává ze tří základních komponent:

- (1) podpůrné struktury (scaffoldu),
- (2) buněk a
- (3) signálních molekul (nebo růstových faktorů).

Scaffold – jeho materiál a struktura, hrají významnou roli a ovlivňují nejen strukturu vytvářené tkáně a viabilitu buněk, ale topografie povrchu zcela zásadně ovlivňuje proliferaci a také diferenciaci buněk. V případě buněk (ad (2)) hraje významnou roli, zda se jedná o buňky kmenové nebo somatické. Diferenciaci kmenových buněk značně ovlivňují další faktory, jako jsou chemické, topografické, mechanické, elektrické aj. podněty. Tyto podněty mohou do značné míry ovlivňovat také somatické buňky a jejich orientaci. Každý typ tkáně a tedy i každá buňka má specifické požadavky. Proliferaci také pozitivně ovlivňují signální molekuly a dodávané růstové faktory (ad (3)). Ty mohou být navázány a na povrch scaffoldu nebo zabudovány přímo do jeho hmoty. V případě růstových faktorů je možné také jejich přidání do kultivačního média v průběhu kultivace. (*Liao et al., 2008*)

1.1 Nosné struktury pro TI

Scaffold je většinou polymerní struktura napodobující morfologii regenerované tkáně, velice často mezibuněčné hmoty (ECM), a při buněčné kultivaci poskytuje buňkám oporu a umožňuje jejich uchycení, proliferaci, diferenciaci a migraci. Struktura scaffoldu musí být silně porézní. Natolik porézní a s dostatečnou interkonektivitou, aby umožňovala dostatečně rychlé šíření buněk a zajišťovala prostup výživných látek nezbytných pro jejich život a další vývoj. Zároveň však musí být konstrukce scaffoldu dostatečně pevná, aby mohla buňkám sloužit jako přiměřená opora a také vést podněty (např. mechanické). (*Thompson et al., 2000; Subbia et al., 2010; Boland et al., 2004a; Eisenbart, 2007; Liao et al., 2008*)

Scaffold může být ve formě membrány, tubusu, pěny, hydrogelu, svazku vláken, různých trojrozměrných struktur atd. (*Pachence and Kohn, 2000; Liao et al., 2008*)

1.1.1 Materiály

Na materiály používané v tkáňovém inženýrství a implantační medicíně vůbec je kladena celá řada požadavků. Tyto materiály musejí nezbytně být biokompatibilní, tedy vyvolávat žádoucí odezvu organismu. Požadavky na tuto odezvu však nejsou univerzální a liší se pro každou aplikaci. Samozřejmostí je také minimalizace toxicity implantátů a imunitní či zánětlivé reakce na kontakt s ním. Ačkoli na počátku byly pro oblast medicínských aplikací voleny zejména pasivní (inertní) materiály, trendem

současné doby je spíše využívání aktivních materiálů, které vyvolávají požadovanou buněčnou odezvu. (*Pachence and Kohn, 2000*)

Na pasivní materiály, které jsou v současnosti využívány zejména v implantační ortopedii, jsou kladeny stejné nároky jako na materiály aktivní, avšak tyto materiály nejsou biodegradabilní. Naopak zásadním požadavkem je jejich odolnost proti korozi, stabilita strukturních a mechanických vlastností a co nejdelší setrvání uvnitř organismu v nezměněném stavu bez vyvolání reakce. Do této skupiny implantačních materiálů se řadí nerezová ocel, slitiny kobaltu a chromu, tantal, titan a jeho slitiny, Nitinol, keramika, kostní cementy a celá řada kompozitů. (*Katz et al., 2004*) Vzhledem k malému, ale ne zanedbatelnému procentu populace, které vykazuje alergii na nikl, jeho slitiny a další materiály obecně považované za inertní, bývá na povrchu pasivních implantátů prováděna pasivace povrstvením. (*Su et al., 2008; Ösman and Kärner, 2009*) K těmto účelům se využívají například CVD nano-diamantové filmy. (*Grabarczyk and Kotela, 2009*) Na povrch pasivních materiálů mohou být nanášeny i vrstvy aktivní. (*Katz et al., 2004; Su et al., 2008*)

Jako aktivní materiály se v implantační chirurgii a tkáňovém inženýrství využívají polymery – přírodní i syntetické (*Pachence and Kohn, 2000*), bioaktivní keramika, keramické kostní cementy, keramické pěny, bioaktivní sklo, apatity, fosforečnan vápenatý, bioresorbovatelné kompozity (*Katz et al., 2004*) a přírodní materiály jako korál (*Hassan, 2008*) nebo zeolit (*Seifu et al., 2011*).

Tyto materiály se využívají přímo pro hojení tkáně nebo jako náhrady tkání (např. uměle vytvořená kůže). Jsou nezbytně nejen biokompatibilní, ale musí také vyvolávat požadovanou buněčnou odezvu. Vzhledem k tomu, že volba materiálu tuto odezvu zcela zásadně ovlivňuje, je tento aspekt tkáňového inženýrství považován za zcela zásadní. Volené materiály musí splňovat odlišné požadavky (příp. jejich kombinace), jako jsou:

- (1) podpora růstu nové tkáně (Zde je nezbytné zajištění maximální mezibuněčné komunikace a přístupu buněk k výživným látkám, farmaceutikům a růstovým faktorům.);
- (2) prevence buněčné aktivity (Růst tkáně může být v některých případech nežádoucí.);

- (3) řízená buněčná odezva (Zvyšování specifické buněčné odezvy při současném potlačování ostatních);
- (4) zlepšení uchycení buněk a následná buněčná aktivace (Příkladem může být uchycení a proliferace fibroblastů a produkce ECM při obnově dermis.);
- (5) inhibice uchycení a/nebo aktivace buněk (Např. v případě ulpívání krevních destiček na cévní náhradě.);
- (6) prevence biologické odezvy organismu (Např. blokace aktivity protilátek proti autologním či xenologním buňkám využívaným při orgánové transplantační terapii.)

(Pachence and Kohn, 2000)

Vzhledem ke svým funkčním vlastnostem a všestrannosti co do možností zpracování jsou v současné době pro tvorbu podpurných struktur v TI nejvíce využívány polymery. Naprostou většinu z nich tvoří polymery syntetického původu i přírodní biopolymery. Jako příklad mohou být uvedeny chitin, chitosan, celulóza, kolagen, kyselina polymléčná (PLA) a její kopolymery a řada dalších. *(Thompson et al., 2000; Liao et al, 2008)* Všechny zmíněné polymery jsou biodegradabilní. Při použití biodegradabilních polymerů v tkáňovém inženýrství není, v závislosti na typu tkáně, vyžadována trvalá (příp. dlouhodobá) stabilita materiálu. Z tohoto důvodu je doba degradace základním kritériem výběru materiálu pro konstrukci scaffoldu. V případě, že je degradace materiálu příliš rychlá, ztratí scaffold funkci podpory pro růst buněk ještě před zregenerováním tkáně. V opačném případě může pomalá degradace regeneraci brzdit. Z tohoto důvodu bývají často společně zpracovávány materiály s různou dobou rozkladu, aby bylo docíleno co nejlepší shody s požadavky. Problém příliš rychlé degradace materiálu může být řešen také síťováním. Tento postup zároveň zlepšuje mechanické vlastnosti materiálu, které jsou dalším významným kritériem pro jeho výběr. *(Thompson et al., 2000; Eisenbarth, 2007; Liao et al, 2008)*

1.1.2 Metody tvorby scaffoldů pro TI

Existuje celá řada metod využívaných k tvorbě podpurných struktur pro TI. Každá poskytuje jisté výhody, avšak žádná nemůže být považována za univerzální. *(Thompson et al., 2000)* Obecným cílem je tvorba vysoce porézních struktur, která odpovídá požadavkům cílené tkáně a specifickému typu buněk. *(Eisenbarth, 2007)*

Nezbytnou podmínkou kladenou na každou z těchto metod je, že nesmí zhoršit užité vlastnosti zpracovávaného materiálu a snížit jeho biokompatibilitu. (*Thompson et al., 2000*)

Volba konkrétní technologie se však odvíjí nejen od strukturních a mechanických požadavků rekonstruované tkáně, ale samozřejmě také od možností zpracovávaného materiálu a případných dalších nároků na funkčnost (obsah funkčních látek – např. různých faktorů aj.) scaffoldu. (*Subbia et al., 2010; Thompson et al., 2000*) Dále je možné dosahovat požadovaných struktur kombinací některých z uvedených technologií a tvorbou kompozitů (*Yeo and Kim, 2011; Boland et al., 2004a*), případně jejich kombinací s postupy TI již při tvorbě scaffoldu. Příkladem může být prokládání vrstev scaffoldu buněčnou strukturou přímo při zpracování a tím usnadnění a urychlení tvorby konfluentní buněčné vrstvy. (*Yang and Wang, 2010*)

1.1.2.1 Pojení vláken

Tato metoda se využívá k tvorbě scaffoldu ze shluku polymerních vláken, která mohou být pojena dvěma různými postupy (bližší popis uvádějí (*Thompson et al. (2000)* a *Boland et al. (2004a)*). Těmito postupy je možné dosáhnout buď struktury tvořené pouze jedním materiálem (PGA), případně struktury, jejíž mechanické vlastnosti jsou nesený vlákněným materiálem (PGA) a povrchové vlastnosti dalším (PLLA nebo PLGA) (*Boland et al., 2004a*). Tato metoda umožňuje tvorbu scaffoldů o vysokém poměru plochy ku objemu, porozitě vyšší než 80% a rozměrech pórů do 500 μm . Vzhledem k omezením stran volby rozpouštědla, mísitelnosti polymerů a jejich teploty tání, je tato metoda použitelná jen u omezeného počtu polymerů. (*Thompson et al., 2000*)

1.1.2.2 Odpar rozpouštědla a vymývání částic

Tyto metody mohou být využívány samostatně nebo v kombinaci. Principem je rozpuštění polymeru v organickém rozpouštědle a poté přidání porogenu do roztoku. Následuje odpaření rozpouštědla. Vzniklá struktura může být tepelně upravena nebo vložena do lázně nebo evaporována za účelem odstranění porogenu. (*Boland et al., 2004a; Eisenbarth, 2007*) Jako porogen mohou být využity např. soli, sacharóza, led, želatina nebo parafin. Touto metodou mohou být připraveny skafoldy se stupněm porozity přesahující 90% a její nespornou výhodou je široký rozsah dosažitelné

porozity a rozměrů pórů. Rozměr pórů je dán rozměry částic porogenu a porozita závisí na jeho koncentraci. (*Boland et al., 2004a; Eisenbarth, 2007*)

1.1.2.3 Zpěňování (*Gas foaming*)

Tato metoda je založena na schopnosti molekul oxidu uhličitého (CO₂) shlukovat se a tvořit jádra (plynová nukleace). Existuje řada postupů zpěňování a tato metoda může být kombinována i s vymýváním porogenu. (*Boland et al., 2004a*) Porozita a struktura pórů zpěňovaných scaffoldů závisí na množství plynu, jeho prostupu polymerem a typu nukleace, a může dosáhnout až 97% při rozměrech pórů 100 – 500 μm. Zásadní výhodou této metody je tvorba vysoce porézních struktur s malými póry bez využití organických rozpouštědel. (*Boland et al., 2004; Liao et al., 2008*)

1.1.2.4 Vymrazování (*Freeze drying – sušení mrazem*)

Metoda vymrazování je založena na odstraňování rozpouštědla prostřednictvím sublimace. Principem je tvorba homogenizované emulze sestávající z kontinuální fáze polymer/rozpouštědlo a dispergované fáze. Tato emulze je vystavena hlubokému mrazu a vakuu, což vede ke snížení tlaku (parciálního) par rozpouštědla. Následuje kalení v kapalném dusíku. Nakonec jsou voda a rozpouštědlo ze vzniklé struktury odstraněny vymražením. Morfologie scaffoldu závisí na typu polymeru a rozpouštědla a samozřejmě na podmínkách zpracování. Výhodou tvorby scaffoldů metodou vymrazování je, že byla aplikována na řadu a polymerů a umožňuje tvorbu vysoce porézních struktur (95%) s malými rozměry pórů (15 – 35 μm). Značnou nevýhodou je použití toxických rozpouštědel a dlouhá doba tvorby scaffoldu. (*Boland et al., 2004a*)

1.1.2.5 Fázová separace

Metoda fázové separace může být na základě typu fáze rozdělena na (i) separaci kapalná/kapalná fáze nebo (ii) pevná/kapalná fáze. V prvním případě je ochlazením roztoku dosaženo vydělení dvou kapalných fází – s nízkým a vysokým obsahem polymeru. V druhém případě je ochlazením dosaženo tuhnutí a tím separace pevné a kapalné fáze. Rozpouštědlo může být odstraněno vakuovým sušením- viz (i), nebo vymražením – viz (ii). Obě metody využívají organická rozpouštědla, ovšem metoda separace pevná/kapalná fáze zaručuje získání struktury s lepšími mechanickými vlastnostmi, vyšší porozitou (95%) a většími rozměry pórů (600μm). Struktura však

může být značně modifikována koncentrací polymeru, teplotou fázové separace, rozpouštědlem a obsahem dalších látek. (*Boland et al., 2004a*)

1.1.2.6 Zpracování bez pevné formy (SFF, Solid freeform fabrication)

Skupina technologií SFF, nebo také technologií Rapid Prototypingu, je založena na tvorbě trojrozměrných objektů po jednotlivých vrstvách. Tyto metody jsou technologicky na vysoké úrovni a umožňují tvorbu scaffoldů podle přesných počítačových modelů, které mohou být generovány na základě dat získaných rozбором modelované tkáně magnetickou rezonancí (MRI) anebo počítačovou topografií (CT). Tyto metody mohou pracovat se širokou škálou materiálů a tvořit struktury s kontrolovanou porozitou, rozměry pórů a jejich distribucí.

Do této skupiny metod se řadí stereolitografie (SLA), zpracování laminovaných objektů (LOM; Laminated Object Manufacturing), selektivní laserové spékání (SLS; Selective Laser Sintering), modelování kladením taveniny (FDM; Fused Deposition Modeling), vytvrzování na pevném podkladu (SGC; Solid Ground Curing), trojrozměrný tisk (3-DP) a také voskový tisk (Wax Printing). Každá z těchto metod umožňuje tvorbu jiných rozměrů a přesnosti scaffoldu a je limitována zpracovatelnými materiály. (*Boland et al., 2004a; Liao et al., 2008*) Velice zajímavou technologií v této skupině představuje Bioplotter, který je sice omezen velikostí tvořeného objektu, avšak umožňuje inkorporaci živých buněk přímo do struktury scaffoldu. (*Liao et al., 2008*) Více viz *Liao et al., (2008)* a *Řasa and Kerenčaninová, (2012)*.

1.1.2.7 Příprava hydrogelů

Mikro- a nanogely se vyznačují podílem vody v hmotě, biodegradabilitou a chemickými a mechanickými vlastnostmi vhodnými pro potřeby TI.

Existuje celá řada postupů založených na chemickém nebo fyzikálním síťování, které umožňují tvorbu hydrogelů z celé řady biopolymerů. Nejčastěji se z těchto metod využívá heterogenní polymerizace hydrofilních nebo vodorozpustných monomerů polysacharidů za přítomnosti multifunkčních síťovadel. (*Oh et al., 2009*) Kromě toho se využívají fotopolymerizace (*Eisenbart, 2007*), fotolitografie, kontinuální reaktivní extruze a řada dalších. (*Oh et al., 2009*)

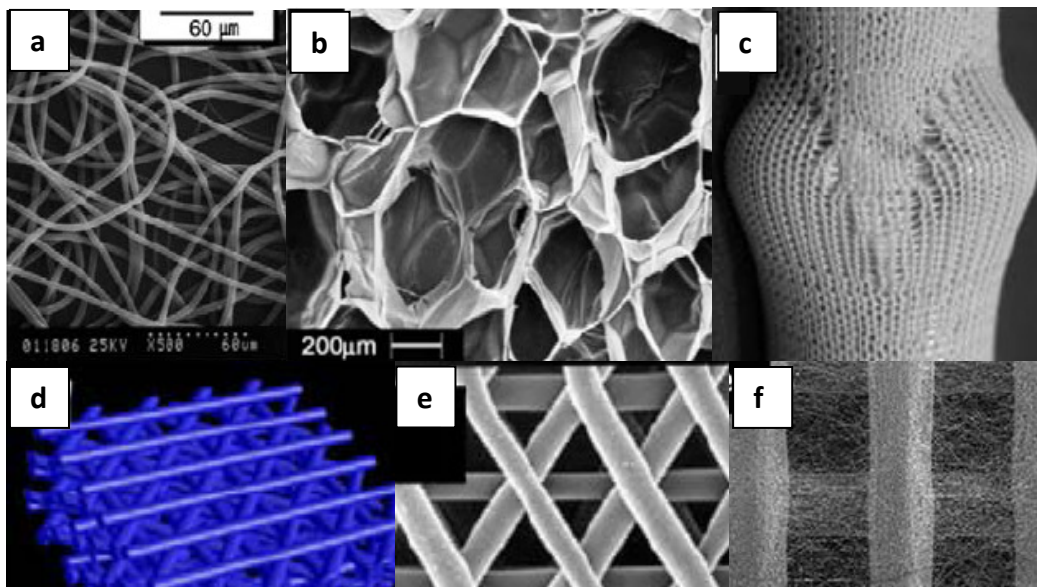
Velice zajímavou technologií v této oblasti představují peptidy se schopností samo organizace. Většinou se jedná o amfifilní molekuly, které jsou schopny reagovat

na změnu podmínek, jako je síla aniontů nebo nárůst pH směrem k neutrálnímu, spontánní samo organizací do náhodně uspořádané vlákenné struktury. Délka takových vláken se pohybuje v řádech mm a jejich tloušťka je průměrně 10 nm. Porozita takto vytvořených hydrogelů se pohybuje od 5 do 20 nm v průměru. Tato metoda představuje jednu z mála technologií umožňujících tvorbu nanovláknenných scaffoldů. (Eisenbarth, 2007; Liao et al., 2008)

1.1.2.8 Další metody

Kromě již zmíněných technologií existuje řada metod značně specifických, kombinovaných nebo jen omezeně využívaných metod. Příkladem může být lití taveniny (Melt Molding), které je analogií kombinace metod odpařování rozpouštědla a vymývání porogenu aplikovanou na taveniny. S těmito metodami je spojena také tzv. metoda extruze, která dále zpracovává vrstvy vzniklé právě těmito technologiemi. Zajímavou metodou je také cílená kapsulace cizích objektů živou tkání a její následné využití. (Boland et al., 2004a)

Velice specifickou metodou přípravy nanovláknenných scaffoldů, jehož obliba v posledních letech exponenciálně vzrůstá, je elektrostatické zvlákňování.



Obr. 1 Struktury pro TI na bázi PCL připravené (a) elektrostatickým zvlákňováním, (b) zpěňováním, (c) pletením, (e) SFF metodou dle počítačového modelu (d) a (f) jako kompozit kombinací ukládání polymerní taveniny (μm) a elektrostatického zvlákňování (nm). (Woodruff and Hutmacher, 2010)

2 Elektrostatické zvlákňování (El-spin)

Elektrostatické zvlákňování je jednoduchá, všestranná a efektivní metoda schopná generovat nanovláknennou netkanou textilii zpracováním polymerního roztoku nebo taveniny. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*)

Ačkoli termín „electrospinning“ (zkráceně electrostatic spinning) byl poprvé použit relativně nedávno (1994), technika sama je stará. Poprvé byla podstata jevu pozorována roku 1897 Rayleighem (*Bhardwaj and Kundu, 2010*) a patentována byla Formhalsem roku 1934. (*Formhals, 1934*) Právě on podal mezi lety 1934 a 1944 sérii patentů popisujících aparaturu a produkci polymerních filamentů za využití elektrostatických sil. Díky pozornosti, kterou tato technologie přilákala, bylo v průběhu posledních 60 let (zejména od 80. let 20. století) podáno více než 50 patentů a nespočet článků s touto tematikou. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*)

2.1 Podstata procesu a aparatura

Při elektrostatickém zvlákňování je na polymerní roztok nebo taveninu aplikován potenciál vysokého napětí, který do zpracovávaného materiálu vnáší volný náboj. Nabité ionty se v reakci na účinek elektrického pole pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem. Vysoký náboj na jednotku plochy má za následek formování části povrchu kapaliny do kónického útvaru. Ten je v případě dosažení kritického napětí označován jako Taylorův kužel s typickým úhlem $49,3^\circ$. U některých kapalin je při dosažení kritického napětí formován kónický útvar s úhlem $33,5^\circ$. Při překročení kritického napětí je překonána rovnováha mezi odpuzivými silami působícími na povrch kapaliny a jejím povrchovým napětím (příp. kapilárních sil). Proto je ze špičky kuželu vymrštěna polymerní tryska. Ta je na výstupu z kuželu krátce stabilní a následně prochází oblastí nestability a chaotického pohybu (bičování). Při průchodu atmosférou dochází k odpařování rozpouštědla a tuhnutí polymerního proudu. Formovaná vlákna jsou následně ukládána na opačně nabitý nebo uzemněný kolektor. (*Bhardwaj and Kundu, 2010; Subbiah et al., 2005*)

Běžně využívaná aparatura sestává ze tří základních komponent: (1) zdroje vysokého napětí, který je připojen ke (2) kapiláře (jehle) vedoucí zvlákňovanou

kapalinu do zvlákňovacího pole a (3) kolektoru. Tato aparatura může být uspořádána horizontálně nebo vertikálně.

Kromě běžné jehlové aparatury existuje řada jiných zařízení. Ta využívají např. princip zvlákňování z volné hladiny – např. tyčková aparatura. Na tomto principu je založena také technologie Nanospider (*Nanospider, n.d.*), která umožňuje kontinuální tvorbu nanovláknenné netkané textilie. V nedávné době byla vyvinuta celá řada inovací běžné aparatury. Ty umožňují například elektrostatické zvlákňování bikomponentních CS vláken (*Mickova et al., 2012*), elektrostatické zvlákňování podpořené proudem vzduchu (blowing assisted electrospinning, electroblowing) (*Wang et al., 2005*). Obsáhlý výzkum byl proveden také v oblasti kolektorů a jejich vlivů na morfologii nanovláknenné vrstvy (*Ramakrishna et al., 2005*).

Metoda elektrostatického zvlákňování umožňuje tvorbu nanovláken z více než 200 syntetických i přírodních polymerů. (*Okhawa et al., 2004*) Nejčastěji jsou elektrostatickým zvlákňováním zpracovávány polymerní roztoky. Nevýhodou zvlákňování z taveniny je nutnost využití vakua a její vyšší viskozita má za následek větší průměr formovaných nanovláken. (*Ramakrishna et al., 2005*)

2.2 Parametry ovlivňující proces

Proces elektrostatického zvlákňování je ovlivňován celou řadou parametrů, které mohou být rozděleny do dvou základních skupin na (1) procesní a (2) systémové. Tyto parametry významně ovlivňují vlastnosti nanovláknenných vrstev – zejména průměr vláken a jeho distribuci, morfologii vrstvy i vláken a počet a rozměr defektů.

2.2.1 Procesní parametry

Mezi procesní parametry se řadí:

- intenzita elektrického pole,
- rychlost toku polymeru,
- geometrie zařízení a
- parametry prostředí.

2.2.1.1 Intenzita elektrického pole

Bylo experimentálně prokázáno, že zvýšení aplikovaného elektrického napětí vyvolává změnu tvaru počátečního bodu trysky a má za následek změnu struktury a morfologie formovaných vláken. Nejenže dochází k nárůstu průměru nanovláken, ale zvýšení napětí vede i k nárůstu četnosti defektů (korálového efektu). (*Subbiah et al., 2005*)

2.2.1.2 Průtok polymeru

Průtok polymeru kapilárou ovlivňuje rychlost trysky a množství hmoty v trysce. Se zvýšením průtoku tedy dochází k nárůstu průměru vláken a rozměrů mezivlákněných pórů. (*Subbiah et al., 2005*)

2.2.1.3 Geometrie zařízení

Za parametry geometrie zařízení jsou považovány rozměry kapiláry a kolektoru a jejich vzájemná vzdálenost.

Zvlákňovací vzdálenost přímo ovlivňuje dobu ukládání nanovláken, odpařování rozpouštědla a délku úseku bičování polymerní trysky. Při zvlákňování je nutné dodržení minimální vzdálenosti, která umožní dostatečné odpaření rozpouštědla. V opačném případě jsou na kolektor ukládána ještě vlhká vlákna a dochází k jejich slepování. Obecně platí, že s rostoucí vzdáleností kapilára-kolektor klesá průměr nanovláken. (*Sill and von Recum, 2008*) Při příliš velké nebo malé vzdálenosti dochází k formování kuliček na vláknech a má vliv i na tvar průřezu vláken. Tuto závislost však není možné popsat obecně, protože se liší dle použitého polymeru. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*)

Tvar kolektoru a případná rychlost jeho pohybu ovlivňují orientaci nanovláken v ukládané vrstvě. Při použití plochého stacionárního kolektoru je ukládána vrstva s náhodnou orientací vláken (*Sill and von Recum, 2008*), zatímco použití pohyblivého (např. rotačního (*Baji et al., 2010*)) nebo profilovaného kolektoru umožňují získání cíleně orientované struktury. (*Xu et al., 2004*)

2.2.1.4 Parametry prostředí

Mezi parametry prostředí se řadí atmosféra, její tlak, teplota a relativní vlhkost (RH). (*Bhardwaj and Kundu, 2010; Subbiah et al., 2005*) Např. nárůst teploty

prostředí vede k nižšímu průměru nanovláken. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*) Relativní vlhkost prostředí (RH) ovlivňuje rychlost odpařování rozpouštědla. To je významné pro mechanismus fázové separace a parametry porézních nanovláken. (*Subbiah et al., 2005; Lubasová and Martinová, 2009*)

2.2.2 Systémové parametry

Systémové parametry mohou být rozděleny na parametry samotného polymeru a na vlastnosti roztoku tohoto polymeru. Kompletní výčet systémových parametrů je uveden v tabulce 1.

Tab. 1 Systémové parametry elektrostatického zvlákňování. (Ramakrishna et al., 2005)

Vlastnosti polymeru	Vlastnosti polymerního roztoku
molekulová hmotnost (Mw)	použité rozpouštědlo
distribuce Mw	koncentrace
tvar makromolekuly	viskozita
	elektrická vodivost
	povrchové napětí
	viskoelasticita
	teplota roztoku

2.2.2.1 Systémové vlastnosti polymeru

Molekulová hmotnost polymeru hraje zásadní roli pro reologické a elektrické vlastnosti, jako jsou viskozita, povrchové napětí a vodivost roztoku. Délka a propletení polymerního řetězce mohou zaručit viskozitu dostačující pro jeho zvlákňování i při nízké koncentraci roztoku. Tvar molekuly je zásadně ovlivněn typem polymeru a rozpouštědlem. Role molekulové hmotnosti může být do značné míry suplována mezimolekulárními interakcemi. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*)

2.2.2.2 Systémové vlastnosti roztoku

Koncentrace roztoku

Elektrostatické zvlákňování může probíhat pouze při koncentraci roztoku, která zaručuje dostatečné zapletení polymerních řetězců. V opačném případě dochází pouze k elektrosprayingu. Obecně je možné říci, že s nárůstem koncentrace roste i průměr nanovláken. (*Bhardwaj and Kundu, 2010; Sill and von Recum, 2008*) Pro stanovení minimální nutné koncentrace jsou zcela zásadní viskozita (a tím i molekulová hmotnost) a povrchové napětí roztoku. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*)

Povrchové napětí

Povrchové napětí zvlákňovacího roztoku je funkcí jeho rozpouštědla. Obecně, vysoké povrchové napětí inhibuje proces el-elspinu, má za následek nestabilitu polymerní trysky a formování kapek polymeru. Snížení povrchového napětí vede k snížení kritického napětí. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*) K snížení povrchového napětí mohou být využity i povrchově aktivní látky (PAL), ovšem jejich přítomnost nemusí být pro některé oblasti aplikace nanovláken žádoucí (např. tkáňové inženýrství). (*Benoit et al., 1988*)

Vodivost roztoku

Vodivost roztoku je dána hlavně typem polymeru a užitým rozpouštědlem. Některé z biopolymerů jsou polyelektrolyty, což ovlivňuje jejich chování v roztoku (viz kapitola 3.3.2). Ionty zvyšují kapacitu vodivosti polymerní trysky, což při jejím vystavené elektrickému poli vede ke zvýšení napětí. Výsledným efektem je snížení zvláknitelnosti daného polymeru. Vodivost roztoku může být zvýšena přidávkou iontové soli (např. NaCl) (*Bhardwaj and Kundu, 2010*) a ovlivňuje ji také pH roztoku. Jeho vlivem na roztoky PVA se zabývali např. *Son et al. (2005)*. Ti zaznamenali výrazný nárůst vodivosti roztoku při vysokých a nízkých hodnotách pH a také rozdílný vliv kyselých a zásaditých podmínek. Při kyselém pH nebylo elektrostatické zvlákňování kontinuální a na vláknech byly pozorovány četné korálkové defekty. Při zásaditých podmínkách byl výskyt defektů omezen a byla formována vlákna s nižším průměrem. (*Son et al., 2005*)

Volba rozpouštědla

Volba rozpouštědla je zcela zásadní pro zvláknitelnost polymerního roztoku a závisí na ní interakce v systému polymer-rozpouštědlo.

Rozpouštědlo má při el-spinu dva základní úkoly: (1) rozpouští polymer a (2) nese rozpuštěné molekuly ke kolektoru. (*Okhawa et al., 2004*) Podstatné vlastnosti rozpouštědla jsou povrchové napětí, dostatečná těkavost, tlak par, bod varu a další. Variace těchto vlastností ovlivňuje zejména průměr nanovláken. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*)

Těkavost rozpouštědla hraje zásadní roli při formování nanovláken během fázové separace polymerní trysky při cestě ke kolektoru. Pro dostatečně rychlé vypařování musí být volena těkává rozpouštědla, která zaručují krátký čas tuhnutí vláken. (*Sill and von Recum, 2008; Subbiah et al., 2005*) Těkavost a další parametry rozpouštědla také ovlivňují morfologii vláken a jejich porozitu. Tvorba porézních nanovláken může být podpořena vypařováním ne-rozpouštědla při fázové separaci. (*Megelski et al., 2002*) Takový postup byl využit k získání porézních nanovláken z PVC (*Lee et al., 2002*), PS (*Megelski et al., 2002*) nebo PCL (*Lubasová and Martinová, 2009*).

Při elektrostatickém zvlákňování má vliv také koncentrace rozpouštědla. Např. v případě kyseliny octové byl s nárůstem koncentrace zaznamenán pokles povrchového napětí roztoku, což vedlo k nižšímu průměru nanovláken. (*Bhardwaj and Kundu, 2010*)

2.3 Vlastnosti nanovláken

Jako nanovlákná jsou označovány lineární útvary, jejichž průměr se pohybuje v sub mikronové oblasti. Tím se nanovlákná řadí do tzv. 2D nano-objektů.

Nanovlákná mají řadu jedinečných vlastností, které z nich dělají skvělé kandidáty pro mnoho aplikací. Hlavní z těchto vlastností jsou průměr v řádech desítek až stovek nanometrů, velký specifický povrch, vysoká porozita a malé rozměry pórů. (*Ramakrishna et al., 2005*) Nanovlákná mají také obecně nižší krystalinitu vlivem velice rychlého tuhnutí. Mechanické vlastnosti nanovláknenné vrstvy jsou dány průměrem vláken, rozměry pórů a orientací vláken ve vrstvě. (*Subbiah et al., 2005*)

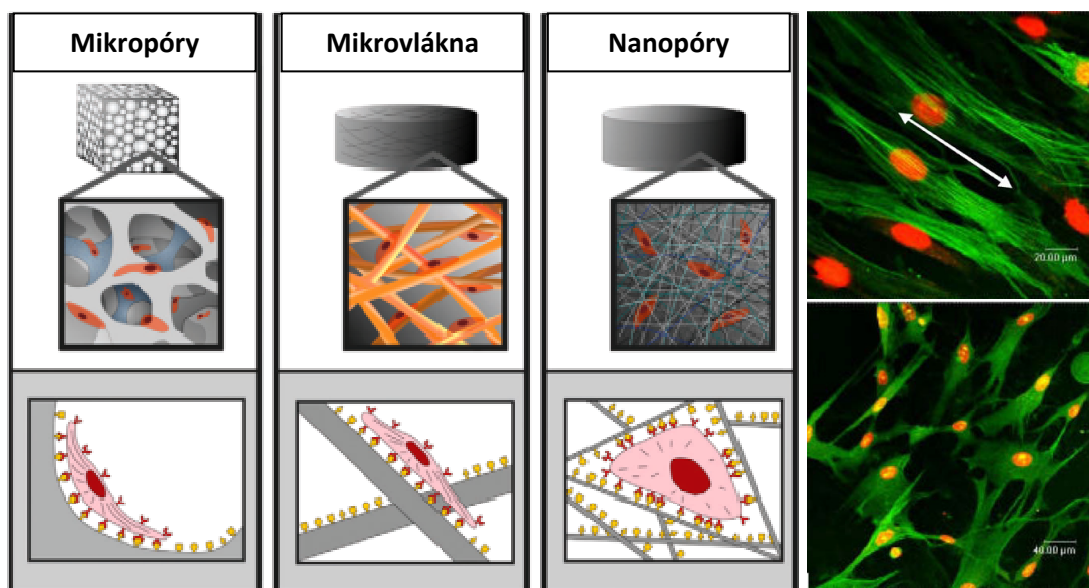
2.4 Využití nanovláken v tkáňovém inženýrství

Jak již bylo zmíněno, jedním ze základních požadavků kladených na skafoldy pro tkáňové inženýrství je napodobení struktury regenerované tkáně. Mezbuněčná hmota (ECM) je v podstatě síť proteinových fibril a nanovláken protkaných řetězci glukosaminykanů. Proto je volba nanovláčenného scaffoldu pro její regeneraci zcela logická.

Topografií scaffoldu a jejím vlivem na chování buněk se zabývá mnoho studií. Řada z nich dokumentuje buněčnou preferenci nanovláčenné struktury a dosažení lepší adheze a proliferace buněk a jejich aktivity. Takový vliv nanovláčenné struktury na buňky byl zaznamenán například u chondrocytů, osteoblastů, neurálních kmenových buněk, endotelních buněk a dalších. Kromě toho byl popsán pozitivní vliv i dalších nano-rozměrných útvarů – výčnělků a pórů, na uchycení a proliferaci buněk. (*Liao et al., 2008*)

Nesporná výhoda použití elektrostaticky zvlákněných nanovláken v TI je možnost kombinace chemických vlastností přírodních polymerů s dobrými mechanickými vlastnostmi polymerů syntetických. Toho je možné dosáhnout například zvlákněním směsi polymerních roztoků. (*Liang et al., 2007*)

Dalšími výhodami el-spinu jsou možnost kombinace nanovláken s jinou metodou a tvorba funkčních kompozitů (*Liao et al., 2008*) a možnost tvorby vrstvy s požadovanou anizotropií. Ta je významná zejména u scaffoldů určených k regeneraci cév (*Xu et al., 2004*) a nervové tkáně (*Cao et al., 2009; Schnell et al., 2007*).



Obr. 2 (a) Efekt morfologie scaffoldu na uchycení buněk. Orientace buněk na (b) anizotropním a (c) izotropním materiálu (Agarwal et al., 2008; Hashi and Li, 2006)).

2 Funkcionalizace nanovláknenných útvarů

Možnosti jak získat funkcionalizovaný nanovláknenný materiál je mnoho. Jednou z nich je tvorba funkcionalizovaných materiálů přímo při elektrostatickém zvlákňování. Funkcionalizace během tohoto procesu může být realizována (I) získáním specifické morfologie a / nebo orientace nanovláken el-spinem (II) vhodného biopolymeru, (III) biopolymeru nebo (IV) směsi, případně (V) inkorporace aktivní látky (léčiva, enzymy, růstové faktory) do zvlákňovacího roztoku. (*Liang et al., 2007*) Možnosti získávání funkcionalizovaných nanovláknenných vstev elektrostatickým zvlákňováním směsí budou přiblíženy později.

Kromě těchto postupů ne možné dosáhnout funkcionalizace úpravou již připravených nanovláknenných vrstev. Existuje několik fyzikálních a/nebo chemických postupů umožňujících povrchovou modifikaci nebo vázání molekul na povrch materiálu.

2.1 Úprava plazmou

Úprava plazmou se využívá ke zvýšení adheze a smáčivosti úpravou chemického složení povrchu bez změny fyzikálních a mechanických vlastností hmoty materiálu. Užitím různých atmosfér a zdrojů plazmy je možné navázání odlišných funkčních skupin pro zlepšení biokompatibility nebo imobilizaci bioaktivních molekul. Přesně se využívá hydrofilizace povrchu účinkem vzdušné a argonové plazmy (např. PCL, PS, silk fibrionu). (*Cheng and Teoh, 2004*)

Při použití kyslíkové (*Landgraf et al., 2009*), amoniové nebo vzdušné atmosféry (reakčního plynu) mohou být na povrch vázány karboxylové nebo amoniové skupiny. Na povrchu mohou být také imobilizovány např. proteiny jako želatina, nebo plazmaticky upravený kolagen (*Cheng and Teoh, 2004*), které umožňují lepší buněčnou adhezi a proliferaci. (*Yoo et al., 2009*)

2.2 Mokré chemické úpravy

Tato metoda je založena na vystavení povrchu alifatických polyesterů částečné hydrolýze při kyselých nebo zásaditých podmínkách. Tato metoda umožňuje úpravu

povrchové smáčivosti (např. PCL) tvorbou karboxylových a hydroxylových skupin na povrchu. Ty mohou být využity k imobilizaci dalších látek. Metoda chemického smáčení není využitelná pro nanovláknenné membrány, ale může být aplikována na obecnější struktury. (*Yoo et al., 2009*)

2.3 Polymerační roubování (graft polymerization)

Tato metoda umožňuje nejen hydrofilizaci povrchu, ale také kovalentní imobilizaci bioaktivních molekul. Tento proces je umožněn předchozí plazmatickou úpravou nebo ozářením UV. Tím dochází k tvorbě radikálů nezbytných pro polymeraci. Touto metodou byl funkcionalizována například PET a PU nanovláknna. (*Yoo et al., 2009*)

Kromě těchto metod je možné využít například schopnost samo organizace některých molekul k tvorbě tenké povrchové vrstvy (např. alkanthiolů $(\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X})$). (*Bílek, 2006*) Dále se využívá chemická imobilizace kovalentními vazbami a také jednoduchý princip adsorpce. Ta je využívána zejména v oblasti dopravy léčiv. (*Yoo et al., 2009*)

3 Biopolymery

Jako biopolymery jsou označovány makromolekulární látky přírodního původu, jejichž hlavními zástupci jsou:

- (1) polysacharidy – celulóza, chitin, škrob;
- (2) polypeptidy (proteiny) – želatina, kolagen, fibroin;
- (3) Polynukleotidy – RNA, DNA;
- (4) Polymery dienů – přírodní kaučuk, gutaperča.

(Vodrážka, 1969; Voet and Voet, 1995)

Struktura biopolymerů má několik úrovní:

- (i) *Primární struktura* určuje pořadí monomerních jednotek v řetězci (např. sekvenci aminokyselin v polypeptidovém řetězci).
- (ii) *Sekundární struktura* určuje vzájemnou prostorovou pozici dvou sousedních článků řetězce (např. pozici peptidické vazby v řetězci).
- (iii) *Terciální struktura* udává prostorový vztah mezi nesousedícími segmenty makromolekuly a tím celkový tvar jednotlivých řetězců (např. tvar zapleteného řetězce proteinu příp. jednoho β řetězce hemoglobinu).
- (iv) *Kvartérní struktura* vzniká spojením několika řetězců dané terciální struktury nekovalentními vazbami, čímž vzniká vyšší celek (např. kompletní struktura hemoglobinu).

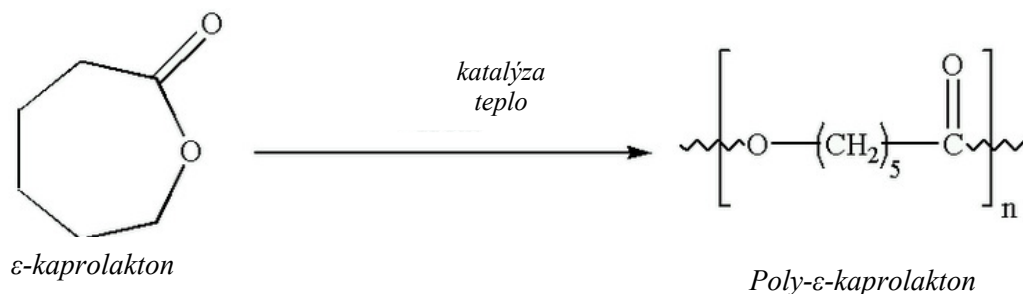
(Vodrážka, 1969; Voet and Voet, 1995)

Chemické složení, délka a struktura řetězce zásadně ovlivňují chování biopolymerů při zpracování a jsou zásadní také pro chování biopolymeru v roztoku. Řada přírodních biopolymerů se kupříkladu řadí mezi polyelektrolyty, což značně ovlivňuje jejich chování v roztocích a tím i možnosti jejich zpracování.

3.1 Syntetické biopolymery

Jako syntetické biopolymery bývají někdy označovány syntetické biodegradabilní polymery (*Van den Velde and Kiekens, 2002*). Ty jsou, stejně jako biopolymery přírodní, biologicky rozložitelné, ovšem nemají natolik složitou strukturu. Jejich výhodami jsou možnost úpravy jejich vlastností a tvorby kopolymerů a dobré

mechanické vlastnosti, které mohou být kopolymerací ovlivňovány. Alespoň částečný výčet těchto polymerů poskytují *Van den Velde and Kiekens (2002)* a *Liand et al. (2007)*



Obr. 3 Schéma přípravy syntetického biodegradovatelného polymeru PCL. (PCL, n.d.)

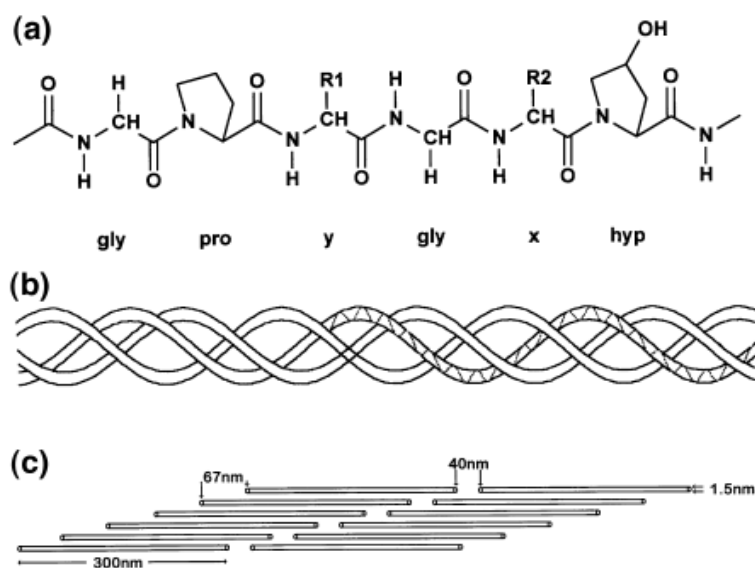
3.2 Kolagen

Kolagen je nejčastěji se vyskytující protein v lidském těle a tvoří asi 30% všech proteinů. V těle formou ECH jako substrát všech pojivových tkání a je hlavním funkčním komponentem kůže, kostí, šlach a dalších. Zhruba 90% kolagenu se vyskytuje ve fibrilární formě, která je tvořena třemi dlouhými proteinovými řetězci tvořícími šroubovici (γ struktura). Každý ze α řetězců je složen z frekvence $(G-X-Y)_n$ aminokyselin, kde X je často prolin (Pro) a Y hydroxyprolin (Hyp). Široká rodina kolagenů sestává z 20 typů kolagenu. Nejhojněji se vyskytují typy I až V, zcela dominantní formou je však typ I kolagen. Jeho struktura obsahuje hlavně glycin, alanin a prolin (viz tab. 2) Představuje ji šroubovice dvou shodných $\alpha 1$ řetězců a jeden $\alpha 2$ řetězec. (*Beckham et al., 2004*)

Tab. 2 Nejčtenější aminokyselina v typ I kolagenu. (*Beckham et al., 2004*)

Aminokyselina	$\alpha 1(I)$ řetězec	$\alpha 1(I)$ řetězec
Glycin	345 (6)	346 (6)
Alanin	127 (4)	108(1)
Prolin	124(2)	111 (3)
Hydroxyprolin	114	99
Arginin	53 (2)	56 (1)
Kyselina glutamová	52 (2)	46 (2)
Serin	37 (5)	35 (1)
Lysin	34 (2)	21 (1)
Kyselina aspartová	33 (3)	24 (2)
Glutamin	27 (3)	24 (1)
+ ostatní	1056 (42)	1038 (24)

* Příspěvek rezidua mimo šroubovici.



Obr. 4 (a) Primární struktura, (b) sekundární a (c) kvartérní struktura kolagenu (typ I)
(Beckham et al., 2004)

Kolagen je díky svým vlastnostem jako jsou biokompatibilita, biodegradabilita a hemostatické chování využíván zejména na poli medicíny. Využívá se k tvorbě scaffoldů, jeho materiál pro bioaktivní povrchy a k dopravě léčiv. (Lee et al, 2001) Při zpracování kolagenu může dojít k jeho degradaci a rozpadu struktury třemi různými způsoby: proteolýzou, tepelně a chemicky. Při tepelné degradaci dochází k rozpletení šroubovice, kolagen ztrácí konformaci a vzniká želatina s jinými fyzikálními vlastnostmi. Nejběžnější tepelné degradace probíhá hydrolyticky. Stejně se projevuje i chemická degradace vyvolaná například koncentrovanými minerálními kyselinami (HCl, H₂SO₄). Mechanickou a chemickou stabilitu je možné zlepšit síťováním kolagenu. (Beckham et al., 2004; Richard-Blum and Ruggiero, 2005; Lee et al., 2001)

3.3 Roztoky biopolymerů

Roztok je soustava dvou nebo více látek, které jsou navzájem dokonale promíchány a tvoří z fyzikálního hlediska homogenní systém.

K rozpouštění dochází při styku amorfního nezesíťovaného polymeru s rozpouštědlem. Při rozpouštění polymeru nastává tzv. solvatace. Během ní se molekuly rozpouštědla vážou kohezními silami na polární skupiny polymeru nebo dochází k vázání kohezním způsobem. Rozpustnost polymeru bývá omezena vysokým stupněm krystalinity nebo zesíťováním polymeru. V takovém případě se jedná o omezené rozpouštění a rozpouštědlo proniká do polymeru pouze v omezeném rozsahu. Rozpouštění se zastavuje v nabotnalém stavu – gelu, a nepokračuje dále přes silně viskózní roztok až k zředěnému. (*Fišner et al., 1968; Mleziva and Kálal, 1986; Krebsová, 1979*)

3.3.1 Rozpouštědla

Z hlediska kvality se rozlišují dva druhy rozpouštědel – a to dobrá a špatná rozpouštědla.

Jako dobrá rozpouštědla jsou obvykle označovány sloučeniny, které jsou vysoce kompatibilní s polymerem a v nichž se segmenty řetězce vyhledávají kontakt s rozpouštědlem. Makromolekula se snaží vystavit působení rozpouštědla co nejvíce svých částí. Střední vzdálenost konců a tedy i objem klubka se zvětšují – dochází k expanzi (botnání) klubka vlivem pronikání rozpouštědla do něj.

Ve špatných rozpouštědlech je klubko více svinuté. Dochází k shluknutí segmentů řetězce do intramolekulárních agregátů, čímž se řetězec snaží vyhnout styku s rozpouštědlem a jsou vytvářeny spíše kontakty mezi jednotlivými segmenty makromolekuly než s molekulami rozpouštědla. Tento efekt se projeví těsným sbalením klubka a označuje se jako kontrakce.

Při použití dobrého rozpouštědla se rozpouštěním polymeru výrazně zvýší jeho viskozita, zatímco při použití špatného rozpouštědla není nárůst takový. (*Vollmert, 1970; Fišner et al, 1968; Bartovská and Šišková, 2005*)

3.3.2 Polyelektrolyty

Polyelektrolyt je vysokomolekulární látka obsahující postranní skupiny schopné elektrolytické disociace. Tou vzniká makroion s velkým počtem elementárních nábojů a příslušný počet malých iontů opačného náboje (protiiontu). Částice makromolekuly v roztocích tedy nesou elektrický náboj, který vznikl disociací.

Podle povahy skupin schopných disociace jsou rozdělovány na polyelektrolyty

- (i) *kyselé* - obsahující kyselé skupiny ($-\text{COO}^-$),
- (ii) *bazické* - obsahující v postranních řetězcích například skupiny NH_3^+ a
- (iii) *amfoterní*, obsahující jak bazické, tak kyselé skupiny (například bílkoviny).

(Bartovská and Šišková, 2005)

Mezi polyelektrolyty se řadí celá řada bipolymerů. Nejznámějším polykationtem je polysacharid chitosan. Většina bílkovin patří mezi amfoterní polyelektrolyty (polyamfolyty). Do této skupiny spadá například kolagen a samozřejmě želatina. Řada vlastností těchto látek v roztoku je ovlivněna konformací makromolekuly. U polyamfolytů je tato konformace značně ovlivňována pH roztoku. To ovlivňuje například rozpustnost bílkovin, které jsou v blízkosti svého izoelektrického bodu (pI) nejméně rozpustné. Důvodem je nulový celkový náboj makromolekuly. S rostoucím nábojem makromolekuly polyelektrolytu však nevzrůstá pouze rozpustnost, ale také například mísitelnost. Hodnota pI bílkovin je značně ovlivněna jejich zpracováním. Zatímco u kolagenu se uvádí hodnota pI 6.6, u želatiny se tato hodnota může pohybovat v rozmezí 4.7 až 9.3 podle toho, jestli se jedná o kyselý nebo zásaditý způsob výroby. Velice zajímavou vlastností polyelektrolytů je schopnost tvorby polyelektrolytických komplexů. *(Kraml, 1999; Hrdová, 2008; Mikeš, 1997)*

3.3.2.1 Roztoky vysokomolekulárních neelektrolytů

Zředěné roztoky neelektrolytů

V případě zředěných roztoků jsou makromolekuly neelektrolytu od sebe vzdálené natolik, že každé makromolekulární klubko je obklopeno jen molekulami rozpouštědla. V roztoku se vyskytují různě svinuté řetězce a jejich konformace se v čase mění (u každé makromolekuly). Tepelný pohyb a otáčivost jednotlivých článků jsou do značné míry ovlivněny prostorovými zábranami, jež mohou být způsobeny přítomností objemných substituentů. Stupeň svinutí klubka v roztoku závisí na afinitě

segmentu makromolekulárního řetězce k rozpouštědлу. Ta je výsledkem interakcí polymer-polymer, polymer-rozpouštědlo a interakcí mezi molekulami rozpouštědla vzájemně. Chování v dobrých a špatných rozpouštědlech je popsáno v kapitole 3.3.1.

Koncentrované roztoky neelektrolytů

U koncentrovanějších roztoků přichází mnoho segmentů řetězce do styku se segmenty jiných vysokomolekulárních řetězců přítomných v roztoku. Následkem toho jsou jednotlivé řetězce propleteny a počet kontaktu mezi segmenty makromolekul vzrůstá s koncentrací. V jednodušších soustavách (případ stejnorodého řetězce v dobrém rozpouštědle) jsou tyto kontakty krátkodobé, jsou rozbíjeny tepelným pohybem a následně se opět vytvářejí na jiných místech. Při počínající fázové separaci nebo u nesterodných řetězců (místa obsahují chemicky nebo strukturně odlišné skupiny) se mohou objevit trvalejší a pevnější spoje. (*Batrovská and Šišková, 2005; Pouchlý, 2001*)

3.3.2.2 Roztoky polyelektrolytů

Na tvorbu klubka u lineárních polyelektrolytů mají výrazný vliv elektrostatické interakce. Těch se zúčastňují náboje ionizovaných skupin řetězce a náboje malých iontů přítomných v okolí a doméně makroiontu. Ve vodě disociuje určitý podíl ionizovatelných skupin, které se stanou nositeli elektrického náboje. Malé ionty (tj. protiionty vzniklé disociací a ionty přidaných solí) vytvářejí v elektrickém poli nabitého řetězce makroiontu iontovou atmosféru. Ta zeslabuje odpudivý účinek nábojů makroiontů a zkracuje jeho dosah s nárůstem koncentrace malých iontů. Změna iontové síly tedy vyvolává výrazné změny konformací makroiontů. V případě polyamfolytů je iontová síla řetězce ovlivněna hodnotou pH roztoku ve vztahu k izoelektrickému bodu (pI) a řídí vzniklý typ makroiontu (*viz obr. 5*).

Zředěné roztoky polyelektrolytů

Ve velmi zředěných roztocích polyelektrolytů (bez přítomnosti solí) jsou jednotlivé makroionty od sebe dosti vzdálené a vzájemně izolované oblastmi rozpouštědla. Oddisociované protiionty jeví tendenci do těchto oblastí expandovat, čímž se snižuje jejich koncentrace v okolí makroiontu a dochází k poklesu jejich odstiňujícího efektu. Za těchto podmínek se odpudivý efekt záporných, resp. kladných nábojů makroiontu projeví velmi silně. Důsledkem je, že řetězec makroiontu

expanduje natolik, že ztratí charakter klubka. Vlivem velkých odpudivých sil mezi souhlasně nabitými skupinami existuje ve formě nataženého řetězce - zcela či částečně napřímené.

Přídavkem nízkomolekulárního elektrolytu do velmi zředěného roztoku polyelektrolytu dochází ke zvyšování iontové síly roztoku a roste odstiňující účinek protiiontu. Dochází ke zkracování dosahu iontové atmosféry makroiontu a svinutí makromolekuly v klubko. Řetězec se svinuje s již malým přídavkem nízkomolekulárního elektrolytu a viskozita roztoku polyelektrolytu klesá. Účinek nízkomolekulárních elektrolytů roste s valencí iontu opačného náboje než náboj makromolekuly.

Stejný efekt se objevuje u řetězců amfoterních polyelektrolytů. U řetězce amfoterního polyelektrolytu, na němž se pravidelně střídají kladné a záporné náboje, dochází vlivem jejich působení k svinutí do cívkového (spirálovitého) tvaru. I v tomto případě se přídavkem nízkomolekulárního elektrolytu k roztoku odstiňuje vliv nabitých skupin a řetězec se přiblíží normálnímu stupni svinutí charakteristickému pro nenabitou molekulu.

Podobný efekt jako přídavek nízkomolekulárního elektrolytu má i nárůst koncentrace polyelektrolytu. (*Batrovská and Šišková, 2005; Pouchlý, 2001*)

Koncentrované roztoky polyelektrolytů

Při nárůstu koncentrace roztoku polyelektrolytu (bez přítomnosti soli) roste spolu s ní i koncentrace vznikajících protiiontů. Ty odstiňují odpudivé elektrostatické interakce mezi náboji na disociovaném makroiontu a zkracují dosah iontové atmosféry makroiontu. S rostoucí koncentrací polymeru expanze makroiontu nejprve prudce klesá, pak se pokles se zpomaluje až do okamžiku, kdy se napřímený řetězec vrátí do formy klubka. (*Batrovská and Šišková, 2005; Pouchlý, 2001*)



Obr. 5 Vliv pH roztoku na náboj na řetězci polyamfolytu. (*Proteomika, 2006*)

4 Polymerní směsi

Mísení polymerů může být velice efektivní metodou pro získání biologicky vhodných materiálů. Účelem mísení polymerů je dosažení vlastností lepších, než jsou vlastnosti jednotlivých složek v závislosti na oblasti aplikace. Optimalizovány mohou být vlastnosti chemické, strukturní, mechanické, morfologické a biologické v závislosti na požadavcích oblasti aplikace. (*Martinová and Lubasová, 2011*)

Jako polymerní směsi (blends, polyblends) jsou označovány materiály vzniklé smísením dvou či více polymerů a formující jeden kontinuální (homogenní) produkt. V závislosti na stupni mísitelnosti mohou mít polymerní směsi podobu

- (i) kopolymeru (blokový, statistický, roubovaný)
- (ii) homogenního systému nebo
- (iii) mikro- nebo makro-heterogenního systému.

Dobrá mísitelnost polymerů může vést až k systému homogennímu na molekulární (makromolekulární) úrovni. Nemísitelnost nebo špatná mísitelnost se projevuje separační tendencí, což vede k hrubé fázové struktuře systému a špatné adhezi mezi jednotlivými fázovými útvary. (*Deanin, 1977; Horák, 1988*) Ty mohou být kulovité, ve formě elipsoidů, fibril a lamel. Výsledné vlastnosti blendu na jeho morfologii silně závisí. (*Martinová and Lubasová, 2011*)

Polymerní směsi mohou být připraveny (i) částečnou, blokovou nebo roubovací kopolymerací, (ii) mísením v tavenině, (iii) mísením roztoků nebo (iv) mísením ve formě latexu. (*Deanin, 1977*) Pro elektrostatické zvlákňování jsou využitelné postupy (i) až (iii).

4.1 Mísitelnost polymerů

Podmínkou mísitelnosti polymerů na makromolekulární úrovni je existence specifických interakcí mezi funkčními skupinami makromolekul nebo mezi segmenty řetězce, aby se překonaly intramolekulární kohezní síly. Tento případ však není častý a obvyklejší je existence omezeně mísitelných polymerů. Jednofázový systém vzniká v případě, že jeden z polymerů je přítomen v malých koncentracích. Velká většina běžných polymerů se však vzájemně nemísí. Uvedené případy mohou být popsány dle

Entropická změna je v podstatě inverzní funkcí molekulové hmotnosti mísených polymerů. Čím větší je molekulová hmotnost, tím větší je počet možných uspořádání segmentů a tedy i entropický člen. V závislosti na molekulové hmotnosti je možné stanovit kritickou podmínku pro mísení jako

$$(\chi_{AB})_{cr} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{x_A^2} + \frac{1}{x_B^2} \right)^2, \quad (4)$$

kde $x_{A,B}$ jsou stupně polymerace. Na základě znalosti vztahu entropie k molekulové hmotnosti je možné entalpii mísení vyjádřit jako

$$\Delta G_{mix} = \frac{RTV}{V_f} \left(\frac{v_A}{x_A} \ln v_A + \frac{v_B}{x_B} \ln v_B + \chi_{AB} \cdot v_A \cdot v_B \right) \quad (5)$$

kde V je celkový objem směsi a $v_{A,B}$ objemové podíly roztoků polymerů A a B. Kombinovaný efekt molekulové hmotnosti a parametrů rozpustnosti tedy umožňuje mísení roztoků s větším rozdílem δ_A a δ_B . (Daenin, 1977)

Mísitelnost roztoků může být podpořena také tzv. kompatibilizací. Za kompatibilizaci je považována jakákoli modifikace mezifázového rozhraní vedoucí k větší stabilitě vícefázové směsi. Kompatibilizace může být provedena řadou postupů, z nichž mezi nejpoužívanější patří přidavek blokových nebo roubovaných kopolymerů, zavedení funkčních skupin do molekul polymerů (umožňujících jejich následnou reakci), přidavek vhodných aditiv (iniciátory roubovacích a síťovacích reakcí, povrchově aktivní látky) a v neposlední řadě přidavek společného rozpouštědla. (Horák, 1998)

4.2 Testování mísitelnosti polymerů

Vzhledem k tomu, že přímé měření termodynamických veličin není možné, používají se k rozlišení mísitelných a nemísitelných polymerů experimentální techniky. Tyto techniky zkoumají kompatibilitu a míru dispergace, nadmolekulární strukturu a morfologii systému. Mezi tyto metody patří elektronová mikroskopie (SEM, TEM), infračervená (IR) spektroskopie, rentgenové metody, gelová permeační chromatografie a diferenciální skenovací chromatografie (DSC). Kompletní výčet metod uvádí Daenin (1977).

5 Elektrostatické zvlákňování polymerních směsí

Hlavní důvody aplikace polymerním směsí v elektrostatickém zvlákňování jsou

- (i) zlepšení charakteristických vlastností nanovláknenné vrstvy,
- (ii) umožnění nebo usnadnění zvlákňování nezvlákňitelných a obtížně zvlákňitelných polymerních roztoků ve směsi s roztokem nosného polymeru,
- (iii) stabilizace ve vodě rozpustných polymerů síťováním vhodnými chemickými skupinami s druhým polymerem,
- (iv) produkce porézních nanovláken extrakcí jedné komponenty z bikomponentních nanovláken a
- (v) kombinace výhod přírodních a syntetických materiálů.

(Martinová and Lubasová, 2011)

Pro biologické aplikace jsou podstatné všechny zmíněné výhody. Pro zpracování nanovláknenných biopolymerních scaffoldů jsou pak nejpodstatnější samotná možnost jejich zvlákňování a výhody, které poskytuje kombinace přírodních – bioaktivních, a syntetických - mechanicky a degračně odolnějších, polymerů. Mísení umožňuje zlepšení jejich jen těžko upravitelných vlastností. Možnost získání ve vodě nerozpustných nanovláken bez užití síťovacích činidel je také významná je výhodná vzhledem k časté toxicitě síťovacích činidel.

Polymerní směsi užívané či zamýšlené pro medicínské účely a tkáňové inženýrství mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin – na směsi organicko-anorganické a organicko-organické. Směsi organicko-organické mohou být dále rozděleny na směsi přírodních polymerů a na směsi přírodních a syntetických polymerů. Směsi pouze syntetických polymerů nejsou v medicínských aplikacích časté vzhledem k možnosti kopolymerace. Využívají se pouze tam, kde kopolymerace není možná, případně kde mísení přináší přidanou užitnou vlastnost. Přípravu orientovaných nanovláken ze směsi polyethylenoxidu (PEO) a polyanilinu (PANI) popisují *Lee et al. (2002)*. Směsi PANI s kyselímléčnou (PLA) se zabývají *Picciani et al. (2010)*. Pro medicínské účely jsou rovněž velice zajímavá bikomponentní nanovláknena typu jádro – plášť (CS), těmi se ovšem tato rešerše nebude zabývat. Základní informace o nich poskytují např. *Liang et al. (2007)* a *Zhang et al. (2007)*.

5.1 Organicko-anorganické směsi

Jako organicko – anorganická nanovlákná jsou označována nanovlákná často z přírodních polymerů, která jsou dopována nanočásticemi. Důvodem takového dopování může být snaha o zlepšení funkčnosti pro určitou tkáň nebo aplikaci nebo zlepšení mechanických vlastností, například u scaffoldů pro tkáňové inženýrství kosti. Anorganický podíl je obvykle rozptýlen v hmotě nanovláken a může mít podobu uhlíkových nanotub (CNT), bioaktivních nanočástic atd. (*Zhang et al. 2007*) Pravděpodobně nejpoužívanější bioaktivní nanočásticí je hydroxyapatit (HAp), který je často aplikován pro zlepšení vlastností scaffoldů pro tkáňové inženýrství kosti. Jeho elektrostatické zvláknování ve směsi z kolagenu (typ I) v podílu 30% (hm.) se zbývají *Teng et al. (2008)*. Pro kostní tkáň jsou vzhledem ke struktuře a složení kosti zajímavé také nanočástice CaCO_3 .

PCL nanovlákná s příměsí CaCO_3 až do 75% (hm.) podílu popisují *Fujihara et al.* Tato nanovlákná byla úspěšně testována na uchycení kostních buněk (*Zhang et al., 2007*). Kromě uvedených částic jsou užívány také částice stříbra, která vykazují antibakteriální vlastnosti. *Hang et al. (2010)* vytvořili nanovlákná ze směsi PVA/CS, kde byl přirozený antibakteriální účinek chitosanu podpořen přidavkem AgNO_3 nanočástic v 1% (hm.). Přítomnost nanočástic také vedla ke zlepšení zvláknitelnosti. Kromě nanočástic je uváděno také dopování nanovláken léčivy a vitamíny. Příkladem jsou celulózoová nanovlákná dopovaná vitamíny A a E. (*Lee et al., 2009*)

5.2 Organicko – organické směsi

Při zvláknování směsí biopolymerů je významná polyelektrolytická povaha. Ta ovlivňuje jejich mísitelnost, zvláknitelnost a možnou tvorbu komplexů. Zřejmě nejčastějším popisovaným případem je tvorba komplexů s chitosanem, který je v podobě polykationtu schopen tvořit komplex s řadou polysacharidů (alginát, kyselina hyaluronová), proteinů (kolagen) i syntetických polymerů (PLA, PAA). (*Dakhara and Anajwala, 2010*)

5.2.1 Směsi přírodních biopolymerů

Směsi dvou přírodních polymerů se používají za účelem lepší biofunkčnosti scaffoldu pro danou tkáň napodobením její nativní podoby, např. směs kolagenu a

elastinu. Dalším důvodem je snaha o zlepšení mechanických vlastností. Z tohoto důvodu jsou zvláknovány směsi s chitosanem. Ten je díky přítomnosti amino a hydroxylových skupin tuhý a křehký. *Cai et al., (2010)* popisují el-spin chitosanu (CS) a silk fibroinu (SF). Ti potvrdili zlepšení mechanických vlastností a nárůst průměru nanovláken s podílem SF. Kompletně mísitelnou směs chitosanu a želatiny (G) popisují *Dhandayuthapani et al. (2010)*. Elektrostatickým zvlákněním této směsi byla získána nanovlákná o průměru 120 až 220 nm. V porovnání s G nanovlákná došlo u směsi CS/G k nárůstu pevnosti v tahu z 7,20MPa na 37,9MPa. Ve směsi se želatinou je zvláknována také kyselina hyaluronová (HA). Přídavkem HA byla zlepšena zvláknitelnost želatiny z vodného roztoku a byla získána nanovlákná HA/G s průměrem 190 – 500 nm. HA byla úspěšně zvlákněna také ve směsi s zeinem (Z, hlavní kukuřičný protein). Autoři uvádějí nárůst průměru nanovláken HA/Z s rostoucím podílem zeinu. (*Lee et al., 2009b*)

5.2.2 Směsi přírodních a syntetických polymerů

Směsi přírodních a syntetických biopolymerů se využívají zejména ke kombinaci bioaktivity a mechanických vlastností. Kromě toho bývá dosaženo zlepšení navlhavosti hydrofobních polymerů jako je PCL, což usnadňuje adhezi buněk na jejich povrch. Tento efekt popisují např. *Zhang et al. (2007)*. Ti dosáhli zvlákněním PCL ve směsi s želatinou dobré navlhavosti povrchu a zlepšení buněčné proliferace. Oproti PCL došlo u PCL/G ke snížení pevnosti a zlepšení tažnosti. Tato nanovlákná připravena ze směsi roztoků G a PCL v 2, 2, 2 – trifluorethanolu (TFE) v poměru 1:1 (*Liang et al. 2007*). Kromě TFE se želatina, kolagen a chitosan zvláknují z roztoku v 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro – 2 – propanolu (HFIP) samostatně i ve směších. Vzhledem k toxicitě HFIP je pro medicínské účely výhodnější použití směsí rozpouštědel na bázi vody – ethylacetátu a vodného roztoku kyseliny octové v poměru 2:3. Zvlákněním roztoku 11% G v této směsi rozpouštědel byla získána nanovlákná o průměru 47 – 145 nm. Případ polymerních směsí zvláknováním z této směsi však nebyl nalezen.

Zajímavou směsí s obsahem želatiny je trikomponentní směs PLGA – želatina (G) – elastin (E) (PGE) zpracovaná *Li et al.* Z této směsi byla získána homogenní nanovlákná s průměrem 380 nm. Tato směs byla úspěšně testována na růst H9C2 kryších srdečních myoblastů. (*Agarwal et al., 2008.*)

Velice často je vzhledem ke svým špatným mechanickým vlastnostem a zvláknitelnosti s chemickými biopolymery mísen chitosan. Jednou z možností je jeho mísení s PVA, který je známý svou snadnou zvláknitelností. Zvlákněním různých koncentrací a podílů PVA/CS se zabývají například *Jia et al. (2007)*. Ti popisují zhoršení zvláknitelnosti a nárůst průměru nanovláken s rostoucím podílem CS, zřejmě kvůli nárůstu vodivosti a viskozity. Kromě toho popisují snížení krystalinity. Zvlákněním směsi PVA/CS ze směsi roztoků PVA v H₂O a CS ve zředěné AA (2 % hm.) popisují také *Hang et al., 2010*. Zvláknění této směsi z vodného roztoku popisují také *Lee et al. (2009a)*. Ti prokázali vznik vodíkových můstků mezi molekulami PVA a CS.

Často je také popisováno zvláknění chitosanu ve směsi s polyethylenoxidem (PEO). *Duan et al. (2004)* popisují zvláknění této směsi v poměrech 1:1 a 2:1 z 2% (hm.) kyseliny octové. S použitím roztoků o celkové koncentraci PEO/CS 4 – 6 % (hm.) byla získána nanovlákná o průměru 80 – 180 nm. Zvláknění směsi PEO/CS ovšem z kyseliny octové o koncentraci 50 % a 90 % uvádějí *Kriegel et al. (2009)*. Úspěšné zvláknění této polymerní směsi popisují také *Martinová and Lubasová (2011)* a *Vondran et al. (2008)*. *Martinová and Lubasová (2011)* popisují také zvláknění chitosanu ve směsi s polyamidem 6. Směs PA 6 a CS byla rozpuštěna a zvlákněna v poměru 8:2 (celková koncentrace 8 – 10 % hm.) ze směsi rozpouštědel kyseliny octové a mravenčí v poměru 2:1. Zvlákněním směsi PA 6/CS se zabývali také *Zang et al. (2009)*, kteří prokázali vznik komplexu. Ve směsi s polyamidem byl úspěšně zvlákněn také keratin. *Zoccola et al. (2007)* dokumentovali pokles viskozity a nárůst průměru nanovláken s rostoucím podílem keratinu.

Jako syntetické biodegradabilní polymery se ve směších s přírodními biopolymery často využívají PCL, PLA, PGA a jejich kopolymery (*Liang et al., 2007*). Zajímavý příklad mísení přírodních biopolymerů s kopolymery uvádí práce *Zhang et al. (2008)*. Tato skupina připravila vlákna s podílem silk fibroinu (SF) a kopolymeru P(LLA-CL) v poměru 1:1. U těchto směsí byl zaznamenán nárůst hydrofobnosti a změna mechanických vlastností s nárůstem podílu SF. Úspěšně byl také zvlákněn dextran ve směsi s PLGA. (*Liang et al., 2007*)

Kromě směsí uvedených v této krátké rešerši byla úspěšně zvlákněna celá řada směsí s polysacharidy – alginátem, celulózou, kyselinou hyaluronovou, ale také

škrobem, dextranem a heparinem. (*Lee et al., 2009b*) Výčty dalších elektrostaticky zvlákněných polymerních směsí uvádějí například *Liang et al. (2007)*, *Cao et al. (2009)* nebo *Agarwal et al. (2008)*.

Kolagen jako jeden z hlavních zástupců proteinů bude s ohledem na zaměření této práce diskutován samostatně.

5.3 Elektrostatické zvláknování kolagenu

Pro elektrostatické zvláknování kolagenu byla dlouhou dobu používána rozpouštědla 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), 2,2,2-trifluorethanol (TFE). S jejich pomocí byly zvlákněny různé typy kolagenu – typ I až IV. Zvláknování kolagenu typ I z tohoto rozpouštědla uvádějí např. *Rho et al., 2006*. Ti publikovali studii, zaměřenou na zvláknování kolagenu z 8% roztoku v HFIP. Získané nanovlákněné vrstvy měly průměr nanovláken kolem 486 nm. Nižšího průměru nanovláken (180 nm) a orientované struktury dosáhli *Zhong et al. (2006)* zvláknováním kolagenu na hranu rotujícího kolektoru. U té to struktury byla zřejmě díky orientované struktuře zlepšena proliferace králíčích RFG. Elektrostatické zvláknování kolagenu III v tomto rozpouštědle uvádějí kupříkladu *Boland et al. (2004a)*. HFIP a podobná silná organická rozpouštědla jsou pro biologické účely nevhodná. Jsou ekologicky nešetrná a byl prokázán jejich denaturační účinek. (*Sell et al., 2009; Agarwal et al., 2009*.)

Ačkoli se velice dlouho zdálo, že HFIP (příp. TFE) je jediné rozpouštědlo umožňující elektrostatické zvláknování kolagenu bez nosných polymerů, *Dong et al.* publikovali v roce 2009 článek o el – spinu kolagenu ze systému voda/alkohol/sůl. Tento systém – konkrétně PBS ethanol, umožnil získání nanovláken kolagenu typu I ze zvláknovacího roztoku s pH = 7. U nanovláken nebyla zaznamenána změna struktury (denaturace). S použitím vyšší koncentrace soli získali *Dong et al. (2009)* nanovlákná o průměrech 540 a 210 nm. *Dong et al.* také úspěšně zvláknili kolagen typ III. O zvláknění roztoku kolagenu ze slabě kyselých roztoků se už v roce 2001 snažili *Huang et al. (Rho et al., 2006)*. Úspěšné využití roztoku kyseliny octové uvádějí *Liu et al. (2010)*. Ti ve své práci úspěšně připravili nanovlákná kolagenu (K, typ I) z roztoku 25 % (hm.) ve 40 % kyselině octové. Elektrostatické zvláknování kolagenu v přítomnosti kyseliny octové bylo uváděno již dříve. Například *Foltran et al. (2008)*

pracovali s jejím zředěným roztokem (pH 2,5), ovšem zvláknován nebyl polymerní roztok ale suspenze.

Nevýhodou elektrostatického zvláknování kolagenu v čisté formě jsou chabé mechanické vlastnosti a nutnost síťování. Síťovadla používaná pro kolagen – např. glutaraldehyd (*Rho et al., 2006*), jsou často z hlediska tkáňového inženýrství problematická. Jako vhodné síťovací činidlo může být použit například 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC) (*Sell et al., 2009*), případně fotochemické síťování (*Liu et al., 2010*).

5.3.1 Zvláknování směsí s obsahem kolagenu

Zlepšení mechanických vlastností kolagenu může být dosaženo jeho zvláknováním ve směsi s biodegradabilními syntetickými polymery. Jeho zpracování s přírodními polymery potom podporuje bioaktivitu a biofunkčnost scaffoldu. Případně může jít o snahu o napodobení nativní skladby tkáně. Zvláknováním směsí dvou typů kolagenu se zabývají například *Boland et al. (2004b)* a *Matthews et al. (2002)*. Kolageny typ I a III jsou strukturní jednotky mnoha typů tkání. *Matthews et al. (2002)* zvláknili tyto dva polymery v poměru 50:50 z HFIP. Průměr získaných nanovláken se pohyboval kolem 390 nm. Ze stejného důvodu byla zpracována i kolagenní nanovláknina s obsahem elastinu. *Boland et al. (2004)* popisují přípravu nanovláken ze směsi kolagenů I, III a elastinu v poměru 40:40:20. Získaná vlákna měla průměr cca 490 nm. Literatura uvádí také zvláknování kolagenu ve směsi s některými polysacharidy. *Zhong et al. (2007)* popisují zvláknování kolagenu ve směsi s chondroitin sulfátem. Tato směs byla zvlákněna ze směsi rozpouštědel TFE:H₂O v poměru 4:1. Získaná nanovláknina o středním průměru 260 nm vykazoval při testech na proliferaci fibroblastů lepší výsledky než kolagen (HFIP). Přípravou 3D nanovláknenných scaffoldů ze směsi kolagen/kyselina hyaluronová (HA) se zabývají *Kim et al. (2008)*. Ke zvláknění použili směs rozpouštědel roztoku NaOH/DMSO. Zajímavou možnost představují nanovláknina ze směsi kolagenu a chitosanu. Tyto polyelektrolyty jsou schopny tvořit spolu polyanionicko-polykationický komplex. Ten může být použit k napodobení nativní ECM. Nanovláknenný komplex K/CS úspěšně získali *Chen et al. (2007)*. Směs těchto biopolymerů v poměru 50:50 byla zvlákněna ze směsi rozpouštědel THF a TFA (kyselina trifluoroctová). Variací celkové

koncentrace roztoku mezi 6 % až 10 % hm. byla získána nanovláknna s průměry 300 – 500 nm. S rostoucím podílem CS ve směsi byl pozorován menší průměr nanovláken.

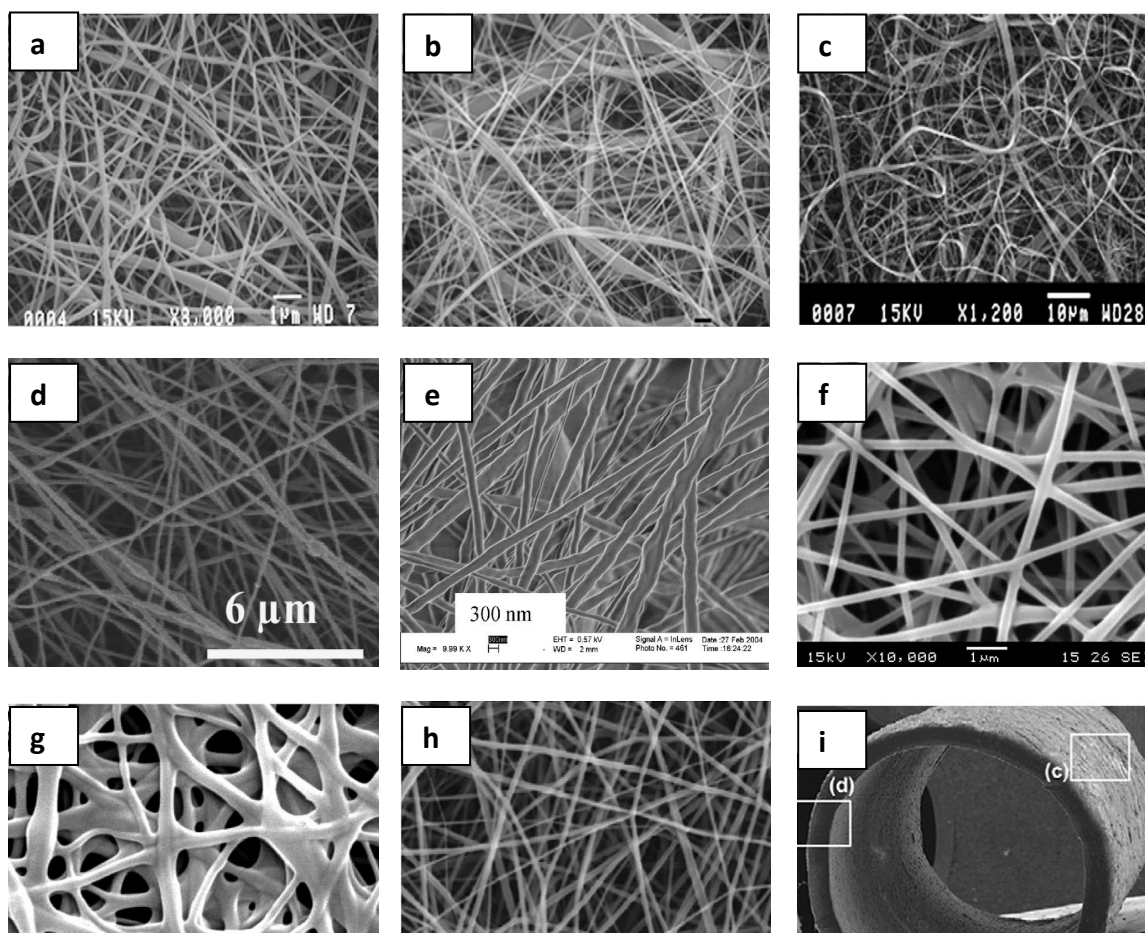
Ze syntetických polymerů jich byla ve směsi s kolagenem zvlákněna celá řada. *Stitzel et al.* vytvořili scaffold pro náhradu cév kombinací kolagenu s PLA. Ve snaze o napodobení struktury nativních cév byl PLA ovinut kolem K nanovláken za účelem zpevnění scaffoldu během regenerace tkáně. (*Sell et al., 2009*) Kolagen (typ I) byl také úspěšně zvlákněn ve směsi s polydioxanonem (PDO). PDO vykazuje vynikající mechanické vlastnosti. V kombinaci s kolagenem, který v ECM funguje jako adhezivní protein, byl získán scaffold splňující po mechanické a morfologické stránce požadavky TI cév. (*Sell et al., 2009*) Vzhledem k velmi dobrým mechanickým vlastnostem se celá řada autorů zabývá zvlákněním kolagenu ve směsi s PCL. *Choi et al. (2008)* získali nanovláknna s poměrem PCL:K 1:1 zvlákněním z HFIP. Zvlákněním na rotující kolektor byla získána nanovláknna, jejichž průměr byl ovlivněn rychlostí kolektoru. Při 3480 rpm byla získána nanovláknna s průměrem zhruba 296 nm. Materiál byl testován na proliferaci svalových buněk hSkMCs. Přípravou orientovaných nanovláken PCL/K se zabývají také *Schnell et al. (2007)*. Ti popisují zpracování směsi PCL:K(I) v poměru 75:25 zvlákněním na lamelový kolektor. Takto byla získána nanovláknna o středním průměru 541 nm. Získané struktury byly testovány jako scaffold pro regeneraci nervové tkáně. Skupina *Lee et al.* testovala mechanické vlastnosti nanovláknenného tubulárního scaffoldu PCL/K jako cévní náhrady. *Lee et al.* prokázali, že přidavkem kolagenu do PCL byla zvýšena odolnost nanovláken v tlaku (zhruba 4912 mm Hg). U vrstvy PCL/K o průměru nanovláken 520 nm byla zjištěna pevnost v tahu 4 MPa. Jiní autoři udávají pevnost této směsi až 7,8 MPa při průměru nanovláken 210 až 225 nm. (*Sell et al., 2009*) Testována byla také in vivo stabilita. *Tillman et al. (2009)* úspěšně testovali tubulární nanovláknennou PCL/K náhradu jako bypass aorty králíka. Jak uvádějí, struktura si udržela integritu déle než jeden měsíc. Kolagen byl také úspěšně zvlákněn ve směsi s kopolymerem P(LLA-CL) (70:30). I u tohoto materiálu se uvádí možná aplikace v TI cév. (*Sell et al., 2009*)

Zvlákněování kolagenu bez užití HFIP – tedy např. z roztoků zředěných kyselin je možné ve směsi s hydrofilními polymery. Již v roce 2001 připravili *Huang et al.* nanovláknennou vrstvu PEO/K (I) s průměrem nanovláken 100 – 150 nm. (*Huang et al., 2001*) Polymerní směs kolagenu s obsahem PEO popisují také *Buttafoco et al.*

(2006). Ti úspěšně zvláknili kolagen a elastin z roztoku HCl (10 mM). Pro zajištění zvláknitelnosti však byl nutný přídavek vysokomolekulárního PEO a NaCl.

Tripolymerní směs s obsahem kolagenu připravili *Huang et al.* (2011). Zvlákněním směsi kolagenu, chitosanu a termoplastického polyuretanu (TPU) v poměrech 60:15:25 byly získány nanovláknenné vrstvy s průměrem nanovláken 250 nm až 360 nm. K rozpuštění kolagenu byl opět použit HFIP. CS a TPU byly rozpuštěny ve směsi HFP/TFA. Vrstvy byly testovány na proliferaci diferencovaných buněk (PIECs) a proliferaci a diferenciaci kmenových buněk (SCs).

Toto je pouze malý výčet směsí s obsahem kolagenu. Přehled týkající se zvláknování kolagenu a dalších proteinů a jejich směsí uvádějí *Sell et al.* (2009).



Obr. 7 SEM snímky nanovláknenných vrstev kolagenu (a) I, (b) III a (c) IV zvlákněných z HFIP. Dále (d) SEM K nanovláken z PBS/ethanol, (e) směsi K/elastin 1:1 a K/chondroitin sulfát 1:1 (f) před a (g) po síťování. Dále směs (h) K/PCL (HFIP) a (i) vytvořený tubulární scaffold. (Zhong et al., 2007; Sell et al., 2009; Dong et al., 200; Buttafoco et al., 2006)

6 Shrnutí tezí teoretické části

V teoretické části je věnována pozornost zejména následujícím tématům:

- Tkáňové inženýrství – objasnění principu a základních nároků tohoto oboru. Zaměřuje se také na význam nosných struktur (scaffoldů), volbu materiálu a technologie jejich zpracování.
- Elektrostatické zvlákňování – popis principu a objasnění parametrů ovlivňujících průběh procesu a výsledné vlastnosti nanovláken.
- Shrnutí vlastností elektrostaticky zvlákněných nanovláken a jejich významu jako nosičů pro TI.
- Biopolymery – jejich rozdělení a shrnutí základních vlastností. Vlastnosti a charakteristika polymerních roztoků biopolymerů.
- Teorii mísení polymerů.
- Shrnutí dosavadního vývoje v oblasti elektrostatického zvlákňování biopolymerů a jejich směsí.
- Další možnosti přípravy funkcionalizovaných nanovláknenných struktur relevantních pro obor TI.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7 Cíle experimentu

Cílem experimentu této diplomové práce je vytvoření funkcionalizované nanovlákněné vrstvy s na bázi přírodního biopolymeru, která by mohla být využita jako nosná struktura (scaffold) pro tkáňové inženýrství.

Jako metoda tvorby nanovlákněné vrstvy je v této práci využívána technologie elektrostatického zvlákňování. Jak již bylo postulováno v úvodu této kapitoly, obecným cílem této práce je tvorba nanovlákněné vrstvy funkcionalizované nejlépe již v průběhu elektrostatického zvlákňování využitím vhodné směsi polymerů, případně jinou metodou funkcionalizace aplikovanou na připravená homopolymerní nanovláknena .

Díličími otázkami a úkoly, kterými se experimentální část této práce zabývá, jsou zejména:

- Ověření využitelnosti vytvořených nanovlákněných vrstev v oblasti tkáňového inženýrství
- Příprava a optimalizace roztoků směsi přírodního biopolymeru a syntetického polymeru pro elektrostatické zvlákňování.
- Vyhodnocení morfologie nanovlákněných vrstev a ověření vlivu polymerů a rozpouštědel na ni.
- Analytické prokázání biopolymeru v připravených nanovlákněných vrstvách.
- Aplikace jiné metody funkcionalizace umožňující získání nanovlákněné vrstvy s obsahem zvolených polymerů.
- Vyšetření podmínek následné funkcionalizace nanovláken na její biologickou účinnost.
- Vyšetření vlivu podmínek této funkcionalizace na její účinnost.
- Ověření využitelnosti vytvořených nanovlákněných vrstev v oblasti tkáňového inženýrství.

Vzhledem ke své obsáhlosti byla experimentální část rozčleněna do následujících tří hlavních oddílů.

- (A) Elektrostatické zvlákňování směsí polymerů.
- (B) Dodatečná funkcionalizace nanovláknenné vrstvy.
- (C) Testy tkáňového růstu.

8 Materiály

Vzhledem k výhodám kombinace přírodních a syntetických polymerů v strukturách pro tkáňové inženýrství, byla tato kombinace materiálů použita i v této diplomové práci. Jako přírodní polymer byl zvolen kolagen typu I, který tvoří 90% veškerého kolagenu v organismu a struktury s jeho obsahem mohou být univerzální pro tkáňové inženýrství řady tkání. Nevýhodou tohoto materiálu jsou chabé mechanické vlastnosti zpracovaného kolagenu v porovnání s nativními a také velice krátká doba *in vivo* degradace. Ta se liší dle jeho zdroje, čistoty a zpracování, ovšem obecně se pohybuje v řádu dní. Literatura uvádí poločas *in vivo* degradace čistého kolagenu 4 dny, případně 25 dní u kolagenu síťovaného. (*McPherson et al., 1986*) Při síťování kolagenu však vyvstává otázka časté toxicity síťovadel, např. glutaraldehydu. (*Rho et al., 2006*) Jako syntetický biopolymer byl zvolen poly- ϵ -kaprolakton (PCL). Jeho použití přináší hned několik výhod. Jednak je to dlouhá doba degradace PCL (*Liao et al. 2008*), která se pohybuje v závislosti na molekulové hmotnosti a stupni krystalinity mezi 12 (*Tillman et al., 2004*) a 24 měsíci. Jak bylo prokázáno, nanovláknenné kompozitní materiály kombinující PCL a kolagen jsou si schopny zachovat strukturní identitu a mechanické vlastnosti. (*Van den Velde and Kiekens, 2002*). Další nespornou výhodou je možnost získávání porézních nanovláken a manipulace morfologií struktury nanovláken využitím různých rozpouštěl.

8.1 Poly- ϵ -kaprolakton (PCL)

PCL je biologicky degradovatelný semikrystalický polyester vyráběný z ϵ -kaprolaktonu radikálovou polymerací za otevření kruhu. Příprava a struktura monomerní jednotky tohoto syntetického biopolymeru jsou uvedeny na obrázku 3. Jeho teplota skelného přechodu (T_g) je -60°C , teplota tání (T_m) 60°C . Poly- ϵ -kaprolakton (PCL) použitý v tomto experimentu od firmy Sigma–Aldrich. Molekulová hmotnost polymeru M_n $60 \cdot 10^3$ pro práci v kapitolách A a B. Vzorky pro testy tkáňového růstu (kap. C) musely být, vzhledem k nedostatku materiálu, připraveny z PCL (M_n $45 \cdot 10^3$, Sigma-Aldrich).

8.2 Kolagen

V experimentech byly využity 2 druhy kolagenu typu I. Tyto kolageny se vzájemně liší původem, čistotou a koncentrací rozpouštědla. Vzhledem k tomu, že biopolymer, jehož vlastnosti se liší dle zdroje a zpracování, neuvádějí výrobci molekulovou hmotnost. Obecně se délka trojitě šroubovice molekuly kolagenu typu I pohybuje kolem 300 nm.

Kolagen K1

Kolagen, v textu nadále označovaný jako K1, byl dodán firmou BD Biosciences. Tento vysoce čistý kolagen (= 90% dle SDC-PAGE¹) byl získán ze šlach krysích ocásků a dodán ve formě čirého roztoku o koncentraci 3,75 mg/ml v kyselině octové o koncentraci 0,02 N².

Kolagen K2

Kolagen, v textu nadále označován jako K2 byl poskytnut firmou Elmarco. Tento kolagen typu I o neznámé čistotě byl získán z kuřecích běhů a dodán ve formě nažloutlého prášku (drcené pěny).

8.3 Rozpouštědla

K rozpuštění kolagenu K2 byly použity roztoky kyseliny octové (AA) o hmotnostních koncentracích 70%, 86% a 99% pro kapitolu A, a také 16 – 50% pro kapitolu B. Směsi rozpouštědel pro PCL byly zvoleny na základě *Lubasová and Martinová (2009)*. Dvousložkové směsi rozpouštědel byly voleny tak, aby umožnily tvorbu porézních nanovláken metodou fázové separace, příp. dosažení odlišné morfologie nanovláken, která by mohla být vhodná pro účely TI. Pro metodu fázové separace umožňující tvorbu porézních nanovláken byla zvolena směs rozpouštědlo/nerozpouštědlo v poměru 9/1 (obj.) - tetrahydrofuran (THF)/dimethylsulfoxid (DMSO). Kromě toho byla použita směs tetrahydrofuranu (THF) a

¹ Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného.

² Normalita = „normální koncentrace“ počet chemických ekvivalentů látky v 1 litru roztoku, v současné době není využíváná, neboť nevyhovuje zavedeným jednotkám SI.

kyseliny octové (AA) v objemovém poměru 9/1 umožňující získání odlišné morfologie nanovlákněné vrstvy. Vlastnosti rozpouštědel jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3 Vlastnosti rozpouštědel použitých pro PCL.
(Lubasová and Martinová, 2009; THF, n.d.; AA, n.d.; DMSO, n.d.)

Název	Tetrahydrofuran (THF)	Kyselina octová (AA)	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Vzorec	C₄H₈O	C₂H₄O₂	C₂H₆OS
Molární hmotnost M _m [g/mol]	72,110	60,052	78,130
Teplota tání T _m [°C]	-108,4	11,6	18,0
Teplota varu T _v [°C]	66,0	117,9	189,0
Hustota ρ [g/cm ³]	0,889	1,050	1,100
Tlak par p ²⁵ [kPa]	26,3	2,1	0,08
Zdroj	Lach-Ner s.r.o	Chemapol/Lachema	Penta

9 Použitá zařízení

9.1 Tyčková aparatura

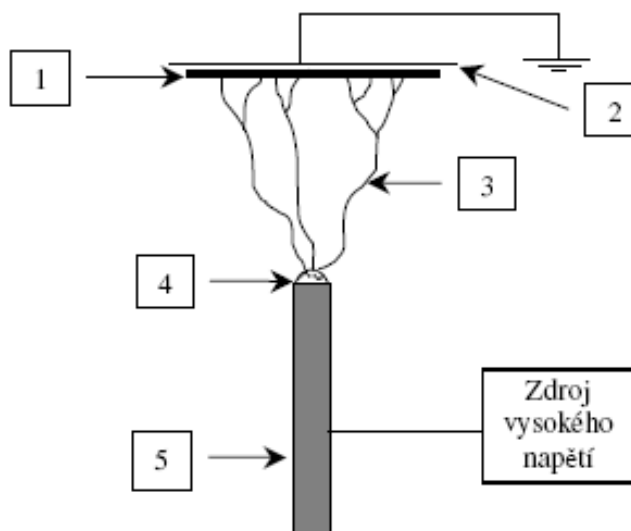
Elektrostatické zvlákňování roztoků polymerů bylo prováděno na tyčkové aparatuře (obr. 8) tzv. z volné hladiny kapaliny. Při této metodě není polymerový roztok nebo tavenina vytlačován kapilárou, ovšem pouze umístěn mezi kolektorem a elektrodou (na jejím povrchu). Destabilizace hladiny kapaliny – tvorba Taylorova kónu a následně polymerní trysky je umožněna při dosažení kritického napětí V_c . Pro které platí

$$\sqrt{4 \cdot \ln\left(\frac{2h}{r}\right) \cdot \pi \cdot r \cdot \gamma \cdot 1,30 \cdot (0,09)} < V_c < \sqrt{4 \cdot \ln\left(\frac{4h}{r}\right) \cdot \pi \cdot r \cdot \gamma \cdot 1,30 \cdot (0,09)}, \quad (6)$$

kde r je poloměr kapiláry (elektrody), h vzdálenost elektroda – kolektor, γ povrchové napětí kapaliny (Pokorný, 2011).

Tato metoda byla zvolena s ohledem na technologii Nanospider, která je založena na stejném principu. Při dosažení dostatečné intenzity zvlákňování a hustoty Taylorových kónů na hladině kapky (hmotnost cca 0,2 g (Lubasová, 2007)) je možné

předpokládat, že dobrý polymerní roztok bude možné zpracovat také kontinuálně na zařízení Nanospider. Při práci na tyčkové aparatuře byly polymerní roztoky zvlákňovány z kruhové plochy o průměru 10 mm, případně plochy nástavce o průměru 25 mm (kapitola C).



Obr.8 Schéma zařízení pro elektrostatičké zvlákňování z tyčky. 1 – podkladový materiál, 2 – uzemněný sběrný kolektor, 3 – polymerní trysky putující ke kolektoru, 4 – kapka polymerního roztoku, 5 – tyčka. (Lubasová, 2007)

9.2 Vakuová plazmatická aparatura

Vakuová aparatura byla vyžita v části B tohoto experimentu. Plazmový výboj byl použit pro iniciaci funkcionalizace nanovláčenného povrchu tzv. polymerizačním roubováním.

Vakuová aparatura pro vysokofrekvenční (RF) plasma byla pro práci zapůjčena Katedrou materiálů TUL. Skládá se z hlavní komory vybavené elektrodou pro vývoj plazmatu, přívodem atmosféry a jejím odtahem. Nerezová elektroda je připojena ke zdroji napětí a slouží k umístění upravovaného vzorku, zbytek komory je uzemněn. To umožňuje intenzivní úpravu vzorku, neboť nejvyšší koncentrace excitovaných částic je právě na povrchu a v okolí této elektrody. Jednoduché schéma vnitřního uspořádání vakuové komory, fotodokumentace zařízení a popis jeho příslušenství je uveden v příloze 1.

9.3 Měření povrchového napětí roztoků

Měření povrchového napětí polymerních roztoků bylo provedeno na digitálním tenziometru K9 (fa Krüss GmbH). Pro měření byla využita tzv. metoda destičkou, která je založena na měření síly nutné k vytažení destičky z kapaliny. K měření se používá svisle zavěšená platinová destička se známou geometrií, jejíž povrch je zdrsňen kvůli lepšímu smáčení. Měření destičkou je tzv. komparační metoda, při níž se měří Wilhelmyho síla vznikající smáčením destičky v roztoku. Tato síla se měří vytažením destičky zpět k hladině. Měřené povrchové napětí je vyjádřeno rovnicí

$$\sigma = \frac{K}{l_b \cos \theta}, \quad (7)$$

kde $\cos \theta$ je smáčecí úhel a l_b smáčecí délka. U vodných roztoků bez povlaku na povrchu je možné předpokládat úhel smáčení rovný nule (úplné smáčení). Faktor $\cos \theta$ je pak roven 1. (K9, 2000)

9.4 Měření pH

Měření pH bylo nejprve orientačně provedeno lakmusovými papírky (PND 50 – 975 – 84, fa Lade – Ner, s. r. o.). Následně bylo provedeno přesné měření na pH metru Eutech pH 700 (Eutech Instruments). Toto zařízení je schopno měřit s přesností $0,01 \pm 0,01$ pH v rozsahu -2 až 16 pH. (pH 700, n. d.)

Měření pH bylo provedeno za účelem ověření chování kolagenu za daných podmínek. Vzhledem k povaze amfolytu je jeho chování v roztoku hodnotou pH značně ovlivněno.

9.5 Elektronová mikroskopie a zpracování vzorků

Elektronová mikroskopie byla použita k ověření vláknové morfologie nanovláknenných vrstev a jejich charakteristik.

ESEM Phenom™

Enviromentální rastrovací elektronový mikroskop (ESEM) Phenom™ (fa FEI) je stolní elektronový mikroskop vybavený CeB6 katodou a umožňující zvětšení až 20 kx.

Tento elektronový mikroskop umožňuje porovnání vzorků bez pokrytí vodivou vrstvou a byl proto využit k primárnímu ověřování morfologie elektrostaticky zvlákněných vrstev, případně sloužil k pořízení snímků s nižším rozlišením při vodivé úpravě povrchu.

SEM Vega TS 5130

Rastrovací elektronový mikroskop Vega TS5130 (fa Tescan) byl použit k získávání snímků nanovlákněných vrstev s vysokým rozlišením. Zařízení umožňuje zvětšení až 500 kx při urychlovacím napětí 500 – 30 kV a pracovním vakuu $5 \cdot 10^{-3}$. Zkoumané vzorky byly před testováním pokryty vodivou vrstvou.

Jako vodivá vrstva byl použit nános zlatého (Au) prášku o tloušťce 15 – 20 nm vytvořený na přístroji SCD 030. Pořízené snímky byly využity k vyhodnocení charakteristik nanovláken v softwaru NIS–Elements AR (fa Laboratory Img., s r.o.).

9.6 Fourierova transformační infračervená spektroskopie (FTIR)

Infračervená spektroskopie (FTIR) v této práci slouží k analýze chemického složení funkcionalizovaných nanovláken. Konkrétně je jím ověřována přítomnost kolagenu v analyzovaných vrstvách a také jeho kvantita. FTIR analýza neumožňuje přesné zhodnocení obsahu složky v materiálu, ovšem umožňuje porovnání kvantitativního obsahu zkoumané složky dle hloubky charakteristických vrcholů (píků).

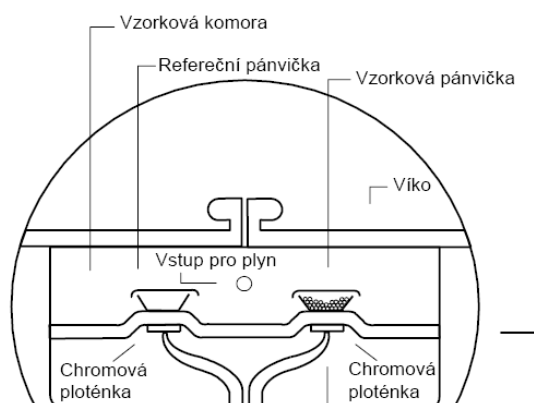
Měření byla provedena na zařízení Spectrum One (fa Perkin – Elmer) s ATR nástavcem. Měřena byla transmittance (T) infračerveného záření materiálem ve střední oblasti (poli) – tedy v rozsahu $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$.

9.7 Diferenciální skenovací analýza (DSC)

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je jednou z technických analytických metod. Při DSC je sledován kompenzační tepelný tok, který je nutný k udržení stejné teploty mezi referenčním standardem a testovaným vzorkem. Konkrétně je měřen elektrický příkon potřebný k udržení izotermických podmínek. Množství uvolněného (odebraného) tepla je přímo úměrné množství elektrické energie spotřebovaném na

zahřátí vzorku (standardu). Schéma komory zařízení viz obr. 9. Při měření je užívána inertní atmosféra zabráňující oxidativní degradaci nebo vzplanutí vzorku. (Vaniček, n. d.) Takto mohou být sledovány efekty vznikající v důsledku endo- nebo exotermických reakcí (chemických), fázové přeměny (tání, tuhnutí) příp. dalších energetických změn sledovaného materiálu. Na základě těchto efektů je možné hodnotit například řadu vlastností materiálů. Pro polymerní směsi je významné sledování mísitelnosti (Mohamed et al., 2008) vícesložkových polymerních systémů a také vlivu podílu složek na krystalinitu výsledné směsi. Krystalinita materiálu je významným parametrem polymerních směsí, neboť ovlivňuje nejen rychlost degradace, ale také řadu mechanických vlastností. Obecně platí, že se zvyšujícím se stupněm krystalinity (v závislosti na struktuře krystalů) vzrůstá tuhost, pevnost a tvrdost polymeru. Zároveň dochází k poklesu tažnosti a také vzrůstají tepelné a další vlastnosti mající souvislost s rozdílnými hustotami krystalické a amorfnní fáze. (Běhálek, 2007)

Metoda DSC byla v této práci použita k ověření vlivu podílu složek směsi na krystalinitu. Kromě toho byla metodou DSC i zběžně testována mísitelnost roztoků. Pro měření bylo použito zařízení Perkin Elmer – DSC 6. Vzorky o hmotnosti $9,6 \pm 0,1$ mg byly testovány v aluminiových celách Perkin Elmer typ 0219-0041. Měření probíhalo v inertní dusíkaté atmosféře při průtoku plynu 20 ml/min při rychlosti ohřevu $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$. Jako referenční standard byla použita prázdná aluminiová celda.



Obr. 9 Schéma komory pro metodu DSC. (Vaniček, n. d.)

A. Elektrostatické zvlákňování polymerních směsí

Elektrostatické zvlákňování polymerních směsí představuje účinný a rychlý způsob tvorby funkcionalizovaných nanovláknenných vrstev. Cílem této kapitoly bylo připravit funkcionalizované nanovláknenné vrstvy s obsahem syntetického a přírodního biopolymeru – konkrétně kolagenu typu I (K) a poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL). Důvody kombinace syntetického a přírodního biopolymeru a jejich volba byly diskutovány v teoretické části této práce.

V jednotlivých podkapitolách jsou zdokumentovány a diskutovány možnosti mísení roztoků těchto biopolymerů v různých rozpouštědlech. Dále chování jejich směsí při zvlákňování a vlivy použitých rozpouštědel na toto chování. Kapitola také dokumentuje vliv použitých rozpouštědel a poměru obou biopolymerů na vlastnosti a vzhled výsledných nanovláken. V neposlední řadě se zabývá také prokazováním přítomnosti a kvantity požadovaných složek v nanovláknenných vrstvách ze směsí biopolymerů.

9.8 Příprava roztoků

Pro elektrostatické zvlákňování byly připraveny roztoky kolagenu K2 o hmotnostní koncentraci 3%, příp. 5%. Vyšší koncentrace nebyly vzhledem k omezenému množství biopolymeru testovány. Pro rozpouštění byly použity roztoky kyseliny octové o koncentracích 70, 86 a 99% (obj.). Roztok K1 byl pro elektrostatické zvlákňování použit v dodávané podobě – koncentrace 3,75 mg/ml v 0,02 N roztoku AA. Pro roztoky PCL ve směsích rozpouštědel THF/DMSO a THF/AA byla zvolena shodná hmotnostní koncentrace 18%.

Oba polymery byly rozpuštěny za stálého míchání. V případě kolagenu K2 byla doba nutná k rozpuštění 3 dny. V případě PCL byla tato doba 2 dny. Těmito postupy byly připraveny roztoky, jejichž základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab.4 Charakteristiky připravených biopolymerních roztoků.

Roztok	Hustota ** [g/cm ³]	Povrchové napětí* [mN/m]	pH*** [-]
18%PCL (THF/DMSO)	0.96	32.56	8.10
18% PCL (THF/AA)	0.94	28.20	2.99
3% K2 (70AA)	1.05	31.24	1.57
3% K2 (86AA)	1.05	31.20	0.69
5% K2 (86AA)	1.07	31.04	0.78
3% K2 (99AA)	1.07	27.54	0.29

* Průměrná hodnota z 5-ti. (viz příloha). *** Měřeno pouze 1x (doplňující měření).

** Určena pouze orientačně jako podíl hmotnosti a objemu.
(Měřeno při 25°C, 42% RH)

9.9 Mísení roztoků

Mísení roztoků polymerů hraje zásadní roli pro zvláknitelnost a rozložení jednotlivých polymerů ve výsledném nanovlákně. Jak již bylo uvedeno v teoretické části této práce, je možné pro elektrostatické zvláknování využívat nejen roztoky, ale také suspenze polymerů. V takovém případě, v aplikaci na směs polymerů je možné předpokládat, že řetězce polymerů nebudou vzájemně provázány, ale v rámci nanovláknů budou uspořádány do samostatných oblastí. Pro získání skutečně funkcionalizovaných nanovláken je podstatné dosáhnout rovnoměrného rozložení v hmotě, případně propletení polymerních řetězců. Z tohoto důvodu bylo stanoveno za cíl získat homogenní roztok s obsahem PCL a kolagenu a ten následně úspěšně zvláknit.

Při zpracování roztoku PCL s kolagenem se jako zcela zásadní parametr projevila kompatibilita roztoků v závislosti na postupu mísení. Ten se lišil na základě směsi rozpouštědel použité k rozpuštění PCL a koncentrace kyseliny octové jako rozpouštědla pro kolageny K1 a K2.

Při mísení roztoku PCL ve směsi rozpouštědel THF/DMSO s roztoky kolagenu K2 se výrazně projevil vliv složení roztoků na postup mísení. Při přidávání roztoků kolagenu K2 do roztoku PCL (THF/DMSO) došlo v podstatě okamžitě ke vzniku

drobných sraženin. Ty se zvyšováním množství roztoku K2 zvětšovaly a jejich zpětné rozpuštění nebylo možné. Tento postup mísení byl možný pouze v případě roztoku K1 – a to do až poměru PCL:K1 5:1 (obj.), a v případě roztoku K2 (70AA) – do poměru PCL:K2 7:3. Při opačném postupu mísení bylo při pomalém vmíchávání roztoku PCL v roztoku K2 možné dosáhnout mísení bez vzniku sraženin a to až do objemového poměru 1:1 (PCL (THF/DMSO):K2 (86AA)). Takto byl získán mírně zakalený homogenní roztok bez okem patrných částic.

Stejný postup mísení byl použit i pro roztok PCL ve směsi rozpouštědel THF/AA. Mísení bylo možné opět do poměru 1:1 (obj.). Směs rozpouštědel THF/AA kromě toho umožnila i mísení prvním zmíněným postupem (přídavek K2 do PCL) opět bez vzniku sraženin. Tento postup mísení umožnil získat objemový poměr 1:1. V případě mísení roztoků PCL do K2 (70AA) toto nebylo možné a ihned po přidání byl pozorován vznik sraženiny. Stejný efekt byl pozorován i při využití tohoto postupu při mísení roztoků PCL a K1.

Diskuze výsledků

Jak vyplývá z výsledků pokusů, při mísení roztoků PCL a kolagenu hraje postup mísení významnou roli. Závisí na složení roztoku PCL a také na koncentraci kyseliny octové (AA) v roztocích kolagenu. Její koncentrace je významná jednak z hlediska ředění při mísení, a také podílu vody vzhledem k hydrofobní povaze PCL, která se projevuje jeho srážením z roztoku při kontaktu s vodou. Jak vyplývá z empirického zkoumání, při mísení kolagenu - roztoky kolagenu, k jejichž rozpouštění je použita AA o nízké koncentraci, mohou být s PCL míseny pouze omezeně a to postupným zvyšováním podílu roztoku kolagenu ve výsledném zvlákňovacím roztoku. V případě mísení PCL s roztoky kolagenu v AA o vyšší koncentraci je vhodné postupovat opačně – tedy zvyšovat podíl PCL ve výsledném roztoku. Jak se zdá, je při mísení takových roztoků výhodnější udržovat koncentraci kyseliny octové (AA) na přibližně stejné úrovni a její postupné, nikoli drastické snižování. Tento postup umožňuje zamezit srážení při mísení roztoků K2 a PCL (THF/DMSO). Srážení, které nastává v opačném případě, je zřejmě způsobeno přítomností DMSO ve směsi rozpouštědel. Dimethylsulfoxid (DMSO, pKa 35) je, stejně jako THF (běžně uváděné pH 7 – 8), polární aprotické rozpouštědlo schopné tvořit komplexy s organickými sloučeninami a tedy i kolagenem. Kromě toho jeho přítomnost zřejmě přispěla k mírné zádaditosti

roztoku. Jak vyplývá z výsledků měření (tab. 4) lze předpokládat, že při prvním testovaném postupu mísení došlo ke skokové změně pH směrem k neutrálnímu. Vlivem skokové změny pH došlo k reakci řetězce kolagenu, který se v kyselém pH chová jako polykationt. Vlivem zvýšení pH zřejmě došlo k smrštění jeho řetězce a precipitaci³ z roztoku.

V případě mísení kolagenů s roztokem PCL (THF/AA) je možné u roztoků o vyšších koncentracích AA použít oba postupy mísení. Tento jev je zřejmě následkem přítomnosti kyseliny octové, která udržuje pH roztoku kyselé (pH 2.99) a při mísení tedy nedochází k precipitaci kolagenu.

Závěrem je nutné uvést, že vysvětlení chemismu mísení u takto složitého (početného) systému je velice obtížné a uvedená vysvětlení jsou pouze domněnky. Je však možné říci, že pro mísitelnost kolagenu se jeví výhodnější udržení kyselého pH. Jak je známo, přítomnost ionizovaných skupin ovlivňuje u polyelektrolytů řadu vlastností včetně mísitelnosti, která s jejich přítomností obecně vzrůstá. (*Dakhara and Anajwala, 2010*) V kyselém pH se kolagen chová jako polykationt, neboť bazické skupiny v jeho molekule mají kladný náboj, zatímco s nárůstem pH (ve středních hodnotách) jsou ionizovány pouze některé kyselé a bazické skupiny. (*Pouchlý, 2001; Dakhara and Anajwala, 2010*) Roztoky PCL/K2 připravené vhodným postupem mísení si udržují kyselé pH, které je 1.88 v případě PCL (THF/DMSO):K2 a 1.63 v případě PCL (THF/AA):K2 v poměrech 1:1.

³ Precipitace – srážení, vznik oddělené pevné fáze ve fázi kapalné. K precipitaci bílkovin dochází buď narušení solvatačního obalu vysolováním nebo ztrátou náboje (prudkou změnou pH do bodu pI). K precipitaci může docházet také vlivem organických rozpouštědel (např. ethanolu, která snižují dielektrickou konstantu prostředí a zvyšují interakce mezi nabitými skupinami biopolymerů. (*Káš et al., 2006*)

9.10 Zvlákňování roztoků biopolymerů

9.10.1 Zvlákňování homopolymerních roztoků

Před samotným zvlákňováním směsných roztoků PCL/K byly ověřovány reakce zvlákňovacích roztoků při elektrostatickém zvlákňování a případné morfologie vzniklých nanovláknenných vrstev.

9.10.1.1 Kolagen (K)

Reakce roztoků kolagen na vystavení elektrostatickému poli byla testována při vzdálenosti zvlákňovací tyčka – kolektor 100 mm. Na kapku polymerního roztoku bylo aplikováno napětí o hodnotě až 70 kV. Při testování roztoku kolagenu K1 nebylo dosaženo ani zvlákňování ani electrosprayingu. Při zvyšování napětí docházelo pouze k deformaci kapky polymerního roztoku a tvorbě vlny na jejím obvodu. Tato reakce se nezměnila ani s přidavkem NaCl.

Velice podobná reakce byla zaznamenána u roztoků kolagenu K2. Testovány byly roztoky o koncentraci 5% (hm.) v 70% a 86% kyselině octové. Ani zde se nepodařilo dosáhnout zvláknění, avšak při aplikaci napětí překračujícím 48 kV došlo u roztoku k vypuzení polymerního roztoku z kapky a electrosprayingu. Přidavkem NaCl bylo dosaženo menších rozměrů kapek.

Diskuze výsledků

Při snaze dosáhnout elektrostatického zvlákňování roztoků kolagenu nebylo dosaženo pozitivních výsledků. Při přidavku NaCl do roztoku K2 byl pozorován vznik menších kapiček při electrosprayingu. Tento jev by odpovídal teorii ohledně roztoků amfolytů, dle které vede přídavek soli při silně kyselém pH roztoku k poklesu viskozity. V případě roztoku K1 se NaCl neprojevil a nebyl pozorován ani electrospraying. Důvodem zřejmě byla velice nízká koncentrace kolagenu v roztoku, která je nedostatečná pro elektrostatické zvlákňování. Přídavek soli a snížení viskozity se u roztoku K2 projevil zmenšením průměru kapek tvořených při electrosprayingu. Jak je známo, electrospraying bývá projevem nízké koncentrace polymerního roztoku. Je tedy možné předpokládat, že při dostatečném zvýšení koncentrace roztoku by bylo možné u tohoto polymeru dosáhnout zvláknění z roztoku zředěné kyseliny octové. Jak uvádí literatura, bylo pozitivních výsledků u tohoto rozpouštědla dosaženo při

zvlákňování 25% roztoku (40AA). (*Liu et al., 2010*) Tento pokus však nebyl k omezenému množství polymeru proveden.

9.10.1.2 Poly- ϵ -kaprolakton (PCL)

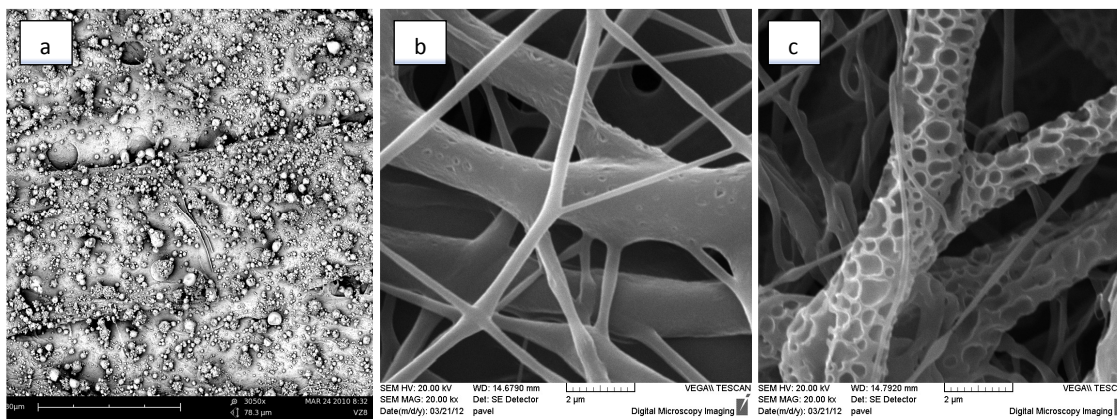
Při testování obou roztoků PCL bylo zaznamenáno ochotné zvlákňování. V případě roztoku 18% PCL (THF/AA) bylo díky kombinaci působení obou rozpouštědel tohoto polymeru získána přímá tenká nanovlákná. Zvlákňování roztoku 18% PCL (THF/DMSO) bylo velice ochotné a intenzivně probíhalo z okrajů kapky. Díky podílu DMSO byla metodou fázové separace získána silně porézní nanovlákná. Póry byly patrné pouze u vláken s průměrem vyšším než cca 500 nm (v závislosti na podmínkách zvlákňování). Při zvlákňování PCL ze směsi rozpouštědel se jako významné parametry ovlivňující porozitu a morfologii nanovláken projeví stáří roztoku a relativní vlhkost (RH) prostředí. Jak dokumentují obrázky P3.11 a P3.12 (v příloze 3), při stárnutí roztoku významně vzrůstá průměr nanovláken (v tomto případě již mikrovláken) a zužuje se distribuce průměrů vláken. V případě relativní vlhkosti (RH) okolí byl s nárůstem pozorován významný nárůst četnosti a rozměrů pórů. (viz obr. 10 b, c)

Diskuze výsledků

Použití dvou směsí rozpouštědel, jejichž základem je THF, byla získána nanovlákná výrazně odlišné morfologie – jednak z hlediska průměrů vláken a také porozity. Rozdílný průměr nanovláken je zřejmě dán povrchovým napětím, které je přidavkem kyseliny octové sníženo. Porozita nanovláken je dosažena již zmíněnou fázovou separací dosaženou přítomností DMSO jako rozpouštědla pro PCL. Jejich účinek se zvyšuje v závislosti na relativní vlhkosti okolí. Tento efekt byl pozorován i u jiných případů přípravy porézních nanovláken metodou fázové separace (např. PS.). (*Casper et al., 2004*) Z toho vyplývá, že pro získání silně porézních nanovláken je výhodnější udržování vysoké relativní vlhkosti (RH) okolí, ačkoli negativním následkem je mírný nárůst průměru nanovláken. Výrazné stárnutí roztoku je zřejmě způsobeno přidavkem DMSO. Vzhledem k tomu, že se pro PCL nechová DMSO jako rozpouštědlo, dochází s jeho přítomností k zhoršování rozpustnosti v čase. Směs THF/DMSO se nechová jako dobré rozpouštědlo. Tím je zhoršena afinita molekulárních řetězců k rozpouštědлу a vlivem mezimolekulárních sil dochází

k asociacím mezi molekulami polymeru a zaplétání řetězců. (Bartovská and Šišková, 2005) Vliv na stárnutí roztoku může mít těkavost THF.

Jak efekt RH, tak stárnutí roztoku by mohly být využity k manipulaci s morfologií směsných nanovláknenných vrstev na bázi PCL. Nevýhodou však je, že vlivem stárnutí roztoku dochází k zhoršení jeho zvláknitelnosti.



Obr. 10 SEM snímky (a) vlivu aplikace vysokého napětí při el-spinu na roztok 5% K2 (86AA) a vlivu RH (b) 37% a (c) 72% na porozitu PCL nanovláken (M_n 45 000).

9.10.2 Zvláknování roztoků směsí biopolymerů

Pro podporu zvláknování nebyl použit přídavek žádného aditiva – soli či PAL. Důvodem je možný negativní dopad přítomnosti reziduí těchto látek při aplikaci vytvořených vrstev v tkáňovém inženýrství. Při zvláknování směsi biopolymerů PCL a kolagenu byl sledován vliv hned několika parametrů roztoků a jejich směsí na proces elektrostatického zvláknování. Výsledky pokusů – tedy kritická napětí a průběhy zvláknování, jsou uvedeny v tabulce 5.

Diskuze výsledků

Jak vyplývá z výsledků uvedených v tabulce 5, reakce roztoků na vystavení elektrostatickému poli je závislá na různých proměnných – směsi rozpouštědel použité pro PCL, koncentraci roztoku kolagenu a jeho rozpouštědla a poměru polymerních roztoků ve směsi.

Tab.5 Výsledky zvlákňování směsí roztoků biopolymerů.

Vzorek	Roztok PCL		Roztok kolagenu		Poměr roztoků (obj.)	Kritické napětí [kV]	Průběh zvlákňování
	Rozpouštědlo	Typ	c _K (%hm.)	c _{AA} (%hm.)			
1	THF/DMSO	K2	3	70	7/3		N
2	THF/DMSO	K2	3	70	7/1	42	+
3	THF/DMSO	K2	3	86	1/1	30	++ Zvlákňování z okrajů, při 41 kV zlepšení
4	THF/DMSO	K2	3	86	1/2	38	E
5	THF/DMSO	K2	5	86	1/1	37	++ 44kV - tvorba provazců.
6	THF/DMSO	K2	5	86	2/3	40	++
7	THF/DMSO	K2	5	86	1/2	40	++ Při 55 kV zlepšení.
8	THF/DMSO	K2	5	86	1/3	42	+
9	THF/AA	K2	3	86	5/1	22	+++
10	THF/AA	K2	3	86	2/1	30	+++ Zhoršení oproti vzorku 9.
11	THF/AA	K2	3	86	1/1	35	++ Zvlákňování z okrajů kapky a pomalé.
12	THF/AA	K2	3	99	2/1	30	+ Zlepšení při 36 kV.
13	THF/AA	K2	3	99	1/1	32	+ Zlepšení při 40 kV.
14	THF/DMSO	K1	3,75*	0,02**	5/1	32	+++
15	THF/DMSO	K1	3,75*	0,02**	7/1	32	+++

* 3,75 mg/ml; ** N (normální koncentrace)

N = nezvlákňuje, E = electrospraying, + = zvlákňování, ale neochotné, +++ = intenzivní zvlákňování

Vliv koncentrace kyseliny octové (AA)

S rostoucí koncentrací AA ve zvláknovacím roztoku dochází ke snížení kritického napětí, ale zároveň také intenzity elektrostatického zvláknování. Dochází tu zřejmě ke kombinaci dvou efektů – vlivu pH na pozici řetězců a tím i viskozitu roztoku a zároveň vlivu povrchového napětí roztoku. Jak vyplývá z teorie amfolytů, při klesajícím pH dochází k nárůstu viskozity z důvodů narůstajících odpuzivých sil v řetězci – v tomto případě pozitivně nabitých ($-\text{NH}_3^+$). Ty způsobují roztahování řetězce. Kromě toho s rostoucí koncentrací AA klesá povrchové napětí roztoku. Snížení povrchového napětí má při elektrostatickém zvláknování běžně za následek snížení kritického napětí. K jeho snížení může také vést silný pozitivní náboj na řetězcích kolagenu. Ten může při aplikaci kladného potenciálu při zvláknování vést k snazšímu vypuzení polymerní trysky směrem k uzemněnému kolektoru. Oproti tomu rostoucí viskozita je zřejmě příčinou zhoršení intenzity zvláknování při vyšší koncentraci AA. Při poklesu koncentrace AA dochází ke křížení těchto efektů – snížení viskozity roztoku při současném zvýšení povrchového napětí. To se projevuje problematickou zvláknitelností roztoků při rozpuštění kolagenu v 70% AA. Jako optimální koncentrace AA se z tohoto pohledu jeví 86% (obj.).

Vliv koncentrace kolagenu v roztoku

Z výsledků uvedených v tabulce 5 vyplývá, že s rostoucí koncentrací roztoku kolagenu vzrůstá také kritické napětí a při práci s 5% K2 (86% AA) byla dokonce pozorována tvorba provazců na kolektoru, pravděpodobným důvodem byla viskozita roztoku. S ohledem na teorii polyelektrolytů byla nižší viskozita očekávána v případě 5% K2, ovšem na celkové viskozitě zvláknovacího roztoku se mohou podílet i případné interakce mezi řetězci obou polymerů. Z tohoto pohledu se jeví jako výhodnější použití 3% koncentrace K2, která umožňuje intenzivnější zvláknování. Na druhou stranu, vyšší koncentrace kolagenu v roztoku umožňuje zvláknění směsí s vyšším podílem roztoku kolagenu.

Vliv poměru složek (PCL/K)

Z dosažených výsledků také vyplývá, že se vzrůstajícím podílem roztoku PCL jednak klesá kritické napětí a zároveň vzrůstá intenzita procesu. Tento efekt je výraznější v případě použití roztoku PCL (THF/DMSO). Důvody zhoršeného

zvlákňování při použití roztoku PCL (THF/AA) jsou diskutovány v předešlých kapitolách. Odlišnost směsí rozpouštědel pro PCL se projevuje také při zvlákňování směsí s obsahem roztoku kolagenu vyšším než 50% (obj.). Roztok PCL (THF/DMSO) umožňuje jeho zvláknění v uvedeném poměru zřejmě díky vyšší viskozitě a povrchovému napětí (v porovnání s PCL (THF/AA)), které ani přidavkem roztoku kolagenu neklesne pod hranici nezbytnou pro elektrostatické zvlákňování.

9.11 Funkcionalizované nanovlákněné vrstvy

Elektrostatickým zvlákňováním z volné hladiny se podařilo připravit několik nanovlákněných vrstev s různým poměrem PCL/K. Jejich výčet doplněný předpokládaným hmotnostním podílem obou složek je uveden v tabulce 6.

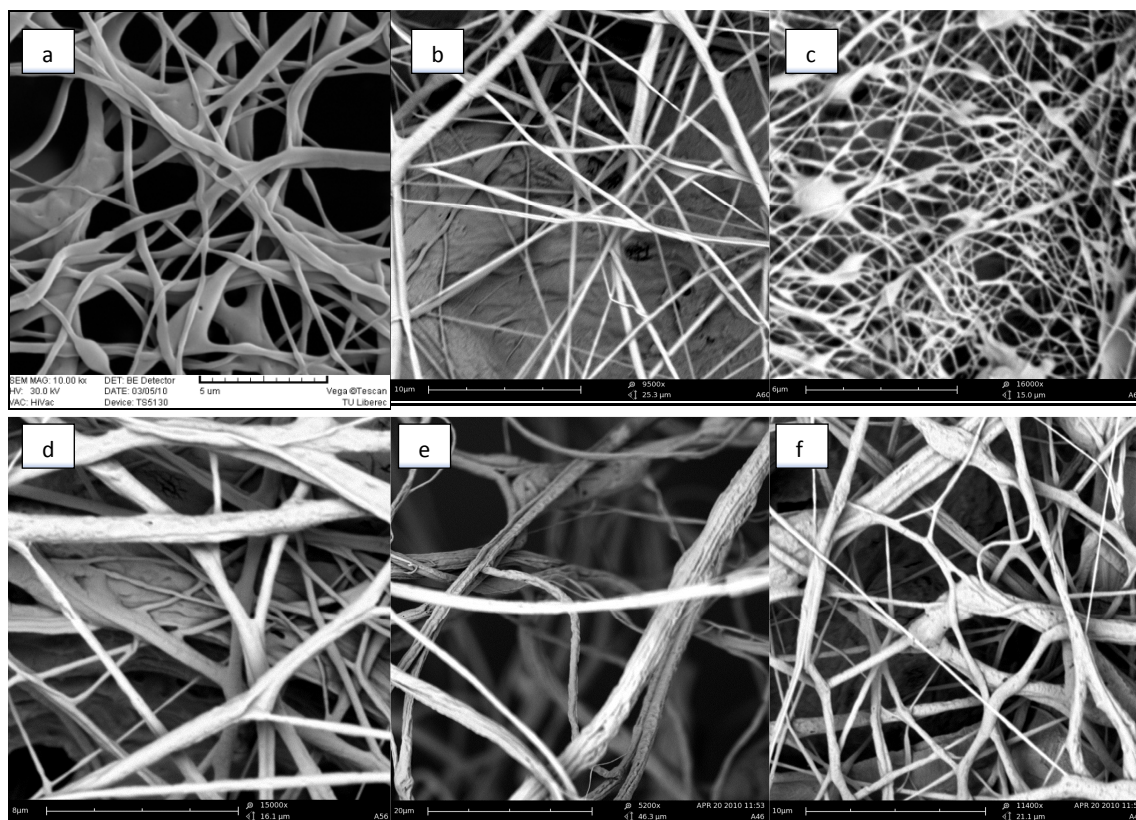
Tab. 6 Nanovlákněné vrstvy PCL/K a poměr složek v nich.

PCL Směs rozpouštědel (obj.)	Kolagen	C_{AA} (%obj.)	Podíl* (%hm.)
THF/DMSO (9/1)	K1	0,02 N	99.6/0.4
THF/DMSO (9/1)	K1	0,02 N	99.7/0.3
THF/DMSO (9/1)	K2	86	86/14
THF/DMSO (9/1)	C2	86	78/22
THF/DMSO (9/1)	C2	86	71/29
THF/DMSO (9/1)	C2	86	64/36
THF/AA (9/1)	C2	86	97/3
THF/AA (9/1)	C2	86	92/8
THF/AA (9/1)	C2	86	86/14
THF/AA (9/1)	C2	99	92/8
THF/AA (9/1)	C2	99	86/14

*Odhad na základě znalosti hustot polymerních a koncentrací polymerních roztoků.

9.11.1 Morfologie nanovlákněných vrstev

Morfologie nanovlákněných vrstev byla studována prostřednictvím elektronové mikroskopie (SEM) za účelem ověření nanovlákněné struktury a vlivu jednotlivých parametrů a procesních podmínek na ni. Kompletní dokumentace připravených PCL/K nanovlákněných vrstev je uvedena v příloze 3.



Obr. 11. SEM snímky nanovláknenných vrstev s podílem (a) PCL/K1 99.7/0.3 a PCL /K2 (b) 86/14, (c) 64/36 zvlákněných s použitím roztoku PCL (THF/DMSO). Dále vliv doby rozpouštění (stárnutí) roztoku PCL (THF/DMSO) na strukturu povrchu nanovláken PCL/K2 86/14 (d, e) a vliv aplikace vysokého napětí na tutéž směs (f).

9.11.2 Vliv rozpouštědel a jejich koncentrací

Jak vyplývá z výsledků uvedených v tabulce 6 a obr. 11, použitím THF jako rozpouštědla pro PCL a jeho vhodné doplnění nerozpouštědlem či ko-rozpouštědlem umožňuje získat celou škálu nanovláknenných struktur funkcionalizovaných přítomností kolagenu. V případě zvláknování směsí s obsahem roztoku PCL (THF/DMSO) dochází k intenzivnímu zvláknování, avšak získaná nanovláknna mají vyšší průměry (v závislosti na podílu kolagenu a procesních podmínkách). Použití této směsi rozpouštědel však za jistých podmínek zmíněných dále umožňuje získat nanovláknna s hrubým povrchem. Kromě toho umožňuje zvláknování roztoků s vysokým podílem roztoku kolagenu. Při použití směsi rozpouštědel THF/AA není zvláknování tak ochotné, avšak s využitím této směsi rozpouštědel mohou být získána nanovláknna o střední hodnotě průměru nižší než 100 nm. Z hlediska koncentrace AA použité pro rozpouštění K2 se jako ideální jeví 86% AA (obj.). U tohoto roztoku bylo zaznamenáno jednak nejsnazší mísení s roztokem PCL a jednak efektivnější

zvlákňování. Při práci s roztoky 70% a 99% AA byla zaznamenána jednak omezená mísitelnost s oběma roztoky PCL a v případě 70% AA se elektrostatickým zvlákňováním nepodařilo získat kvalitní nanovláknennou vrstvu. U roztoků kolagenu s 99% AA byla zaznamenána obtížná zvlákňitelnost a u získaných nanovláknenných vrstev byl pozorován intenzivní perličkový efekt (viz obr. 12 (f)). Ten se nepodařilo zcela odstranit ani zvýšením poměru roztoku PCL ve směsi.

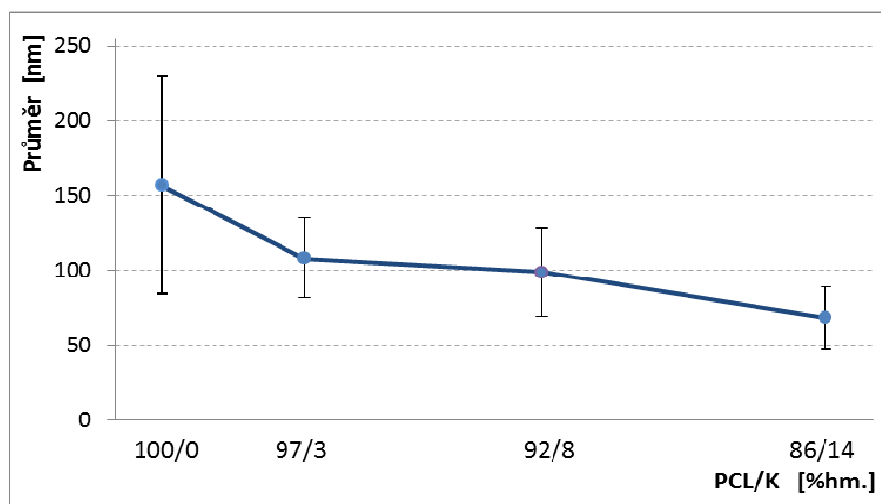
Diskuse výsledků

Rozdílná morfologie nanovláknenných vrstev je s největší pravděpodobností zapříčiněna rozdílnou kvalitou rozpouštědel použitých pro PCL. Kromě toho je zde patrný rozdíl povrchového napětí a pH roztoků, které se odráží i na vlastnostech směsí roztoků. Koncentrace kyseliny octové použité pro rozpouštění K2 potom ovlivňuje pH roztoku a tím i viskozitu. Při snižování pH v kyselé oblasti dochází k nárůstu viskozity roztoku (dle teorie amfolytů) a současně snižování povrchového napětí roztoku. Nízké povrchové napětí je zřejmě příčinou perličkového efektu při práci s kolagenem K2 v 99% AA. Naopak vyšší povrchové napětí kapaliny u roztoku K2 70% AA zřejmě vede jednak ke zhoršení mísitelnosti a také zvlákňování. Efekt povrchového napětí není zřejmě při práci s roztokem kolagenu K1 tak výrazný díky jeho několikanásobně nižší koncentraci v roztoku. Rozdílné chování kolagenu K1 a K2 při mísení je však velice těžko porovnatelné vzhledem k neznalosti molekulové hmotnosti (M_w).

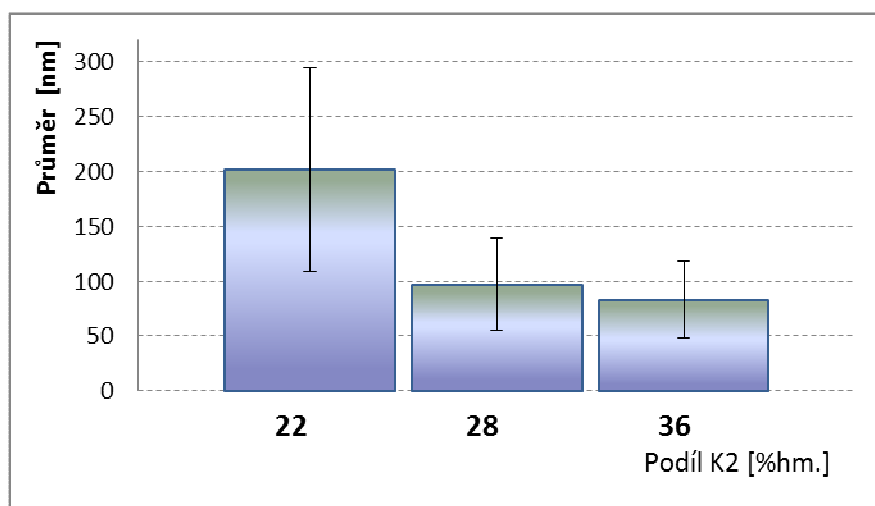
9.11.3 Vliv podílu kolagenu

Obecně je možné říci, že s rostoucím podílem kolagenu v polymerní směsi vlivem zvýšení jeho koncentrace v roztoku kolagenu dochází k nárůstu průměru nanovláken (viz graf 3). Při shodných procesních podmínkách a objemových poměrech roztoků PCL a K2 byl zaznamenán významný nárůst průměr nanovláken při použití 5% koncentrace K2. Je-li však podíl kolagenu ve směsi zvyšován na úkor celkové koncentrace polymerní směsi PCL/K ve zvlákňovacím roztoku (zvyšováním objemového podílu roztoku), dochází k razantnímu snížení průměru nanovláken příp. electrosprayingu. Tento efekt je výrazný zejména při práci 5% roztokem K2, který umožnil tvorbu PCL/K2 nanovláknenných vrstev s průměry nanovláken pod 100 nm při současném podílu kolagenu přesahujícím 22% (viz obr. 11 (c)). V případě podílu 36%

(hm.) byla získána nanovlákná s průměrem 84 ± 36 nm (průměr \pm SD). Tento trend zobrazuje graf 2 a vrstvy včetně statistických charakteristik jsou uvedeny v příloze 3 (obr. 20, 21). Je však ještě nutno připomenout, že se tu opět projevuje vliv vzrůstajícího podílu AA ztížením zvlákňování a zvýšením zvlákňovacího napětí.



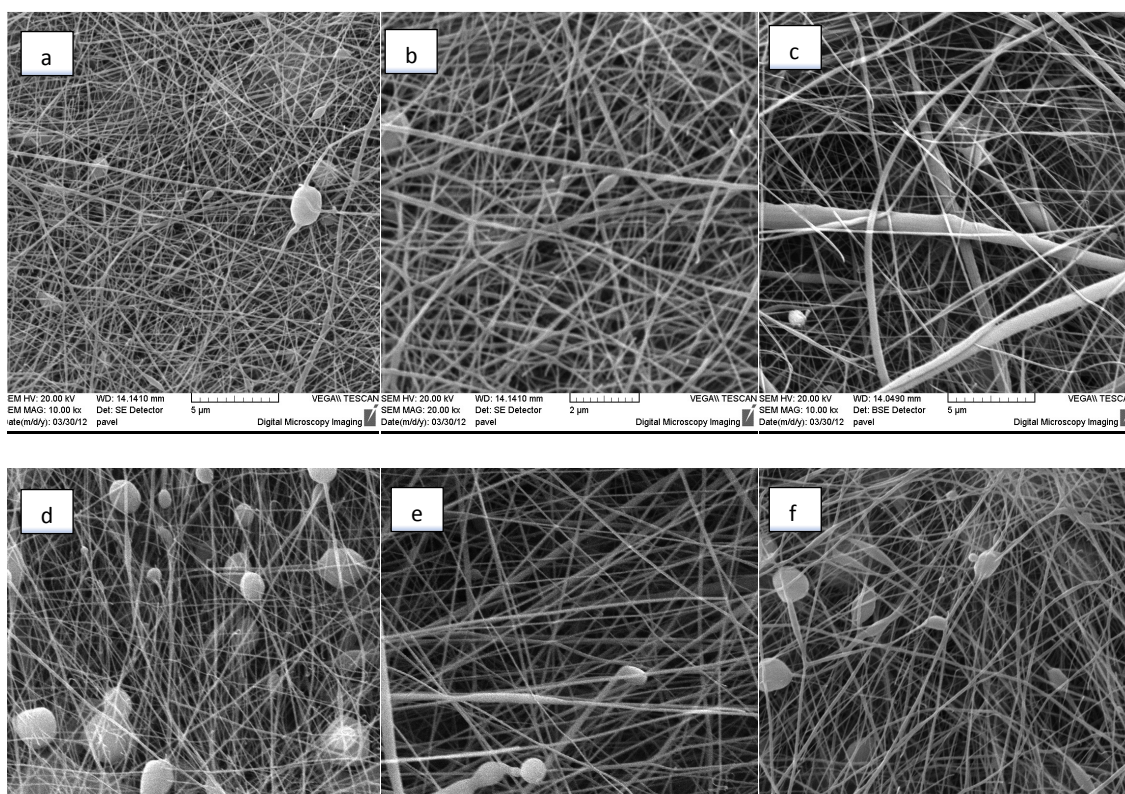
Graf 1 Vliv hmotnostního podílu kolagenu K2 na průměr nanovláken. Zvlákňování ze směsi 18% PCL (THF/AA):3% K2 (86AA) v objemových podílech 1:0, 5:1, 2:1 a 1:1. (Průměr \pm SD)



Graf 2 Vliv podílu kolagenu K2 na průměr nanovláken při manipulace hmotnostním podílem změnou objemového poměru roztoků PCL a K2 (5%). Objemové poměry 1:1, 2:3 a 1:2 (PCL:K2). (Průměr \pm SD)

Diskuse výsledků

Jak je patrné s rostoucí koncentrací směsi biopolymerů ve zvlákňovacím roztoku vzrůstá také viskozita tohoto roztoku. Tento jev neodpovídá teorii polyelektrolytů, kdy by s klesající koncentrací měla vzrůstat viskozita roztoku díky expanzi polymerního řetězce. Ta a další parametry jako povrchové napětí a vodivost jednotlivých polymerních roztoků ovlivňují průměr PCL/K nanovláken. Zde je zřejmě celková viskozita a průměr nanovláken ovlivňován interakcemi mezi žetězci PCL a K. Průměr může být ovlivněn jednak variací objemového podílu a také hmotnostní koncentrace roztoku K2. Nespornou výhodou je zde možnost tvorby ultratenkých nanovláken s vysokým podílem kolagenu. Průměr nanovláken však může být ovlivňován i procesními podmínkami – napětím, zvlákňovací vzdáleností a případně i vlivem okolních podmínek.



Obr. 12 SEM snímky nanovláčenných struktur s podílem PCL/K2 (a,b) 86/14 (%hm.), (c, d, f) 92/8 a (e) 97/3 připravených zvlákňováním směsí 18% PCL (THF/AA): 3% K2 (86AA) v obj. poměru (a,b) 1:1, (c,d) 2:1 a (e) 5:1 a 18% PCL (THF/AA): 3% K2 (99AA) v poměru (f) 2:1. Při zvlákňovací délce 13 cm a napětí (a, b, c, e, f) 36kV a (d) 44kV.

9.11.4 Vliv stárnutí roztoku

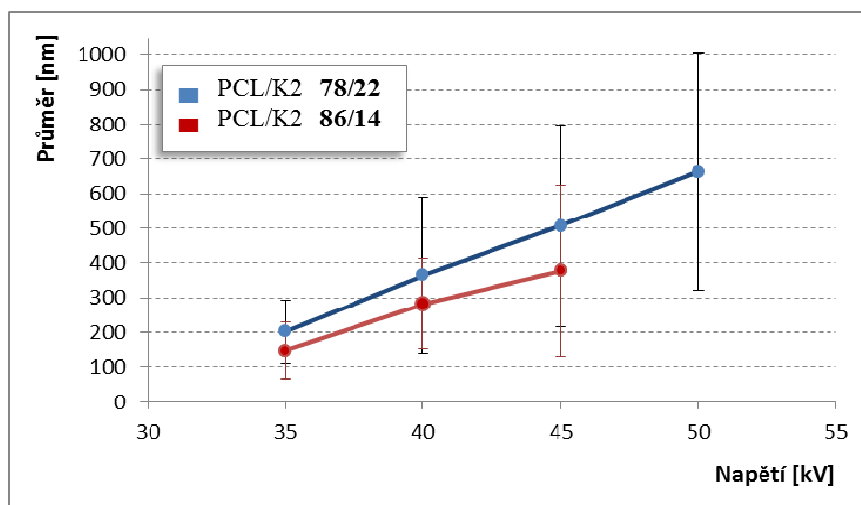
Stárnutí roztoku bylo zaznamenáno i v případě zvlákňování směsi polymerních roztoků. Tento jev byl zaznamenán opět v případě roztoků s obsahem směsi rozpouštědel THF/DMSO. Vlivem stárnutí došlo k mírnému zhoršení průběhu zvlákňování a byl pozorován výrazný nárůst průměrů výsledných směsných nanovláken. Ten je dokumentován obrázkem 12 (d, e). Jak je patrné, při nárůstu doby mísení z 2 na 5 dnů dochází k téměř dvojnásobnému – a to z 283 ± 131 nm na 480 ± 216 nm. Kromě toho je zde patrný vliv na povrch nanovláken, kdy vlivem stárnutí může být získán nikoli porézní, ale „hrbolatý“ povrch nanovláken.

Diskuse výsledků

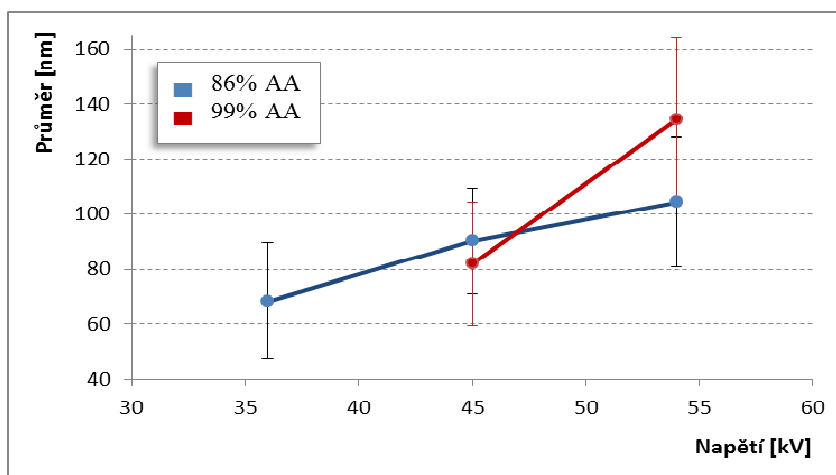
Důvody tohoto jevu mají původ ve zhoršení kvality THF jako rozpouštědla pro PCL vlivem přídavku DMSO. Tento jev má za následek nárůst průměru nanovláken. Stejný jev způsobuje i tvorbu nerovného povrchu nanovláken. Tento efekt však může být vnímán jako pozitivní v případě scaffoldů pro tkáně preferující nano-rozměrné nerovnosti povrchu.

9.11.5 Vliv procesních podmínek

Jak vyplývá z grafů 3 a 4 při nárůstu aplikovaného napětí obecně dochází k nárůstu průměru nanovláken – a to ve všech případech bez výjimky. Aplikované napětí však neovlivňuje pouze průměr nanovláken, ale také strukturu povrchu nanovláken. Jak vyplývá ze SEM analýzy, vede nárůst napětí při zvlákňování roztoků s podílem PCL (THF/DMSO) k hrubějšímu povrchu nanovláken (obr. 11 f). Vliv relativní vlhkosti vzduchu (RH) nebyl na rozdíl od zvlákňování čistého roztoku PCL (THF/DMSO) zaznamenán, ovšem je možné, že zde dochází ke kombinovanému působení s jiným parametrem. V případě aplikace vyššího napětí na roztoky s podílem K2 (99AA) toto vede ke zvyšování intenzity perličkového efektu (obr. 12 f). Tento efekt je patrný i u roztoků s podílem K2 (86AA) ovšem v menší míře (obr. 12 d).



Graf 3. Závislost průměru nanovláken s různým podílem kolagenu K2 (a) 22 %hm. a (b) 14 %hm. na aplikovaném napětí. Zvlákňováno ze směsi 18% PCL (THF/DMSO) : K2 (86AA) v poměru 1:1 při koncentraci roztoku K2 (a) 5% a (b) 3% (hm.).



Graf 4. Závislost průměru nanovláken s podílem kolagenu K2 14 %hm. na aplikovaném napětí při použití různých koncentrací kyseliny octové. Zvlákňováno ze směsi 18% PCL (THF/AA) : 3% K2 v poměru 1:1.

Diskuse výsledků

Změny povrchové morfologie jsou zřejmě zapříčiněny intenzivnějším odparem rozpouštědla, který umožňuje projevit se i velice sníženému podílu DMSO. I malý podíl DMSO ve směsi zde zřejmě umožňuje alespoň mírný efekt fázové separace

využívané při tvorbě porézních nanovláken. Efekt aplikovaného napětí na perličkový efekt souvisí s nízkým povrchovým napětím a nízkým pH u roztoků K2 (99AA).

9.11.6 Chemické složení funkcionalizovaných nanovláken

Analýza chemického složení vytvořených nanovláken byla provedena pomocí IR spektroskopie. Ačkoli se nejedná o zcela precizní metodu, posloužila pro primární ověření přítomnosti kolagenu ve funkcionalizovaných vrstvách a podala alespoň orientační představu o jeho množství. To nebylo vyhodnocováno číselně, ale pouze na základě intenzity píků vibrací skupin specifických pro kolagen typu I.

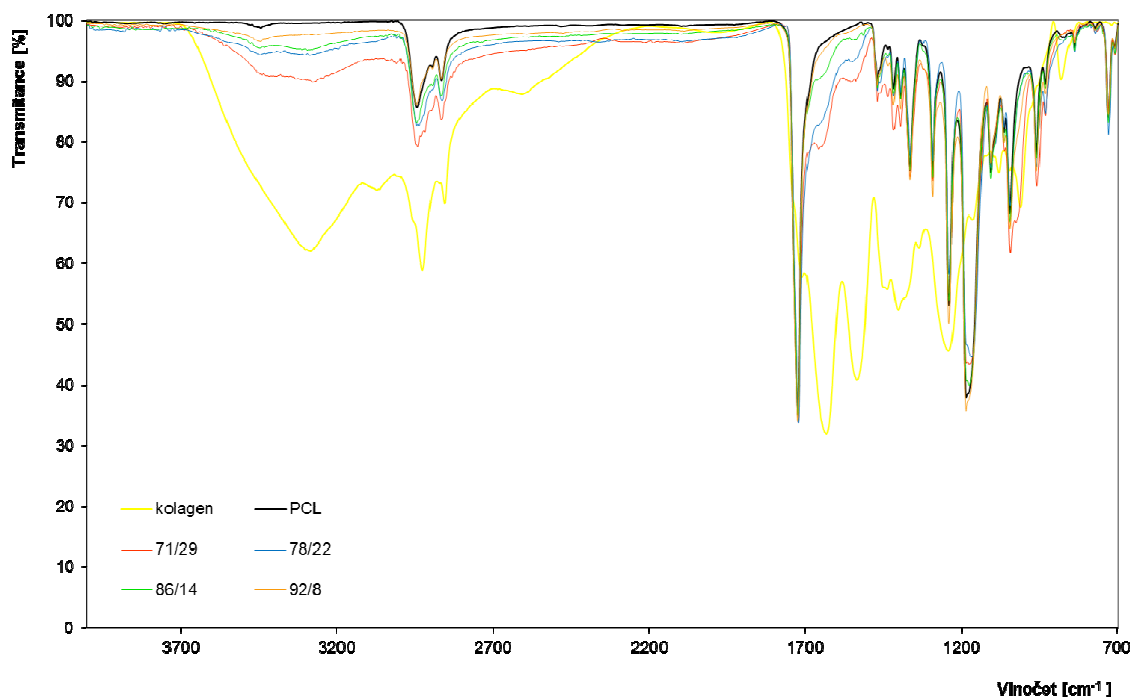
Struktura PCL se projevuje valenčními vibracemi vazeb C-H na intervalu 2970 – 2780 cm^{-1} a dále také valenčními vibracemi C=O vazby (ester) na vlnové délce 1720 cm^{-1} . Kolagen typ I se vyznačuje valenčními vibracemi skupin O-H a N-H v oblasti 3288 cm^{-1} a asymetrickou valenční vibrací vazeb C-H ze skupiny $-\text{CH}_2-$ na vlnových délkách 2921 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} . Dále se zde objevují valenční vibrace vazeb C-H pravděpodobně ze skupiny N- CH_3 na 2600 cm^{-1} a valenční vibrace C=O na vlnové délce 1710 cm^{-1} . Ta je pravděpodobně ketonického původu. Významné jsou valenční vibrace a deformační vibrace I. a II. amidu, které jsou pro kolagen typické a umožňují jeho identifikaci ve zkoumaných vzorcích. Konkrétně se jedná o kombinaci valenční vibrace C=O a deformační vibrace N-H z primárního amidu (I.amid) na vlnové délce 1653 cm^{-1} . Kombinaci valenční vibrace C=O a deformační vibrace N-H ze sekundárního amidu (II.amid) na 1633 cm^{-1} . Dále se objevuje deformační vibrace N-H a valenční vibrace C-H skupiny (II.amid) na vlnové délce 1540 cm^{-1} . Právě tyto tři píky jsou při FTIR analýze funkcionalizovaných PCL nanovláken využívány k ověřování přítomnosti kolagenu a jeho množství. Skeletální vibrace (pod 1500 cm^{-1}) nebyly hodnoceny. Spektra byla vzájemně synchronizována na intenzitě píku valenční vibrace karbonylu (1710 cm^{-1}). Popsané charakteristické vibrace se prokazatelně vyskytovaly u obou testovaných kolagenů (viz příloha 5).

Při hodnocení spekter byla pozorována systematická závislost intenzity píků I. a II. amidu na podílu kolagenu ve vláknech, která s tímto podílem rostla. Stejný trend byl pozorován v případě valenčních vibrací v intervalu 2970 – 2780 cm^{-1} a valenčními vibracemi skupin O-H a N-H v oblasti 3288 cm^{-1} . U testovaných vzorků, uvedených

v grafu 5 byl pozorován prokazatelný nárůst intenzity vibrací sledovaných skupin, ovšem u vzorků s podílem kolagenu nižším než 10% byla velice špatná.

Diskuse výsledků

Jak je patrné ze FTIR spekter, přítomnost kolagenu v nanovláknenných vrstvách PCL/K byla prokázána a to až do poměru složek 92/8. Zhruba od 10% (hm.) podílu nebyl kolagen ve vláknech dle I. a II. amidu prokazatelný. Nárůst valenčních vibrací v oblasti 3300 cm^{-1} má nejspíše spojitost s vodíkovými můstky ve šroubovici kolagenu, ovšem vzhledem k tomu, že je kolagen amfolyt, který byl pracován v kyselém prostředí, není vyloučena ani možnost interakcí mezi řetězci kolagenu a PCL ve formě iontových vazeb nebo vodíkových můstků. Tato domněnka by však musela být prokázána přesnější analytickou metodou např. XPS. Tato metoda by mohla být využita i pro přesné stanovení podílu kolagenu v nanovlákněch.



Graf 5 FTIR spektra funkcionalizovaných nanovláken podílem složek PCL/K2 v poměrech 71/29, 78/22, 86/14 a 92/8.

9.11.7 Krystalinita funkcionalizovaných nanovláken

Diferenciální skenovací kalorimetrie byla v této práci využita k měření vlivu elektrostatického zvlákňování na krystalinitu semikrystalického PCL a také vlivu podílu kolagenu. Kromě toho bylo této metody využito k ověření mísitelnosti obou polymerů. Testovány byly vzorky uvedené v tabulce 7. Měření probíhalo v teplotním rozsahu 20 – 90 °C. Tento rozsah byl zvolen vzhledem k teplotě tání (T_m), která je u PCL 60 °C. Chlazení pod 0 °C a ověření vlivu na teplotu zesklenní (T_g) nebylo vzhledem k vybavení přístroje možné. Krystalinita a další charakteristiky byly tedy ověřovány při chladnutí materiálu. Zvolený teplotní rozsah by měl zahrnovat také teplotu denaturace kolagenu. Ta se u nativního kolagenu liší v závislosti na zdroji. *Knott et al. (1997)* uvádějí zhruba 70 °C pro kolagen ze šlach krutých běháků, zatímco *Skrzyński et al. (2009)* rozmezí zhruba 80 – 90 °C pro kolagen v meziobratlových ploténkách. Vzhledem ke ztrátě nativních vlastností při extrakci a zpracování je možné předpokládat vliv na mechanické vlastnosti, teplotu degradace. To potvrzují *Machado et al. 2002*, kteří uvádějí teplotu denaturace při rozpadu šroubovice zpracovaného kolagenu v rozmezí 47 až 50 °C.

Tab. 7 Složení a podmínky přípravy vzorků pro DSC analýzu.

Vzorek	PCL [%hm.]	K2 [%hm.]	Složení PCL/K [%hm.]	Podmínky zvlákňování	
				Vzdálenost [mm]	Napětí [kV]
1		-	100/0	-	-
2	18%	-	100/0	15	35
3	18%	-	100/0	10	20
4	18%	-	100/0	10	35
5	18%	1%	95/5	10	35
6	18%	3%	86/14	10	35
7	18%	5%	78/22	10	35

Jako kontrolní vzorek zde byla používána PCL fólie připravená odpařením rozpouštědla z roztoku 18% PCL ve směsi rozpouštědel THF/DMSO. Stejný roztok byl také použit k přípravě nanovláčkových vzorků. Roztok kolagenu K2 byl rozpuštěn v 86% AA. Pro dosažení různých podílů ve vrstvách byly použity jeho koncentrace 1%, 3% a 5% (hm.). Roztoky byly míseny vždy v poměru 1/1 (obj.).

Jak je patrné u DSC křivek (příloha 4), testované vzorky vykázaly v měřeném teplotním rozsahu vždy jeden výrazný endotermní vrchol (tání) a jeden exotermní vrchol (rekrytalizace). Kromě toho některé vzorky vykázaly mírný endotermní nárůst křivky (onset) v oblasti kolem 42 °C. Ten může být spojován s přítomností nízkomolekulární látky (např. rezidua rozpouštědla) nebo v případě kolagenu s jeho denaturací a rozpadem trojitě šroubovice.

Kompletní získané výsledky DSC analýzy jsou uvedeny v příloze 4. Na jejich základě byly stanoveny další charakteristiky přeměn. Měrná tepelná kapacita (C_p), doba krystalizace (t_c) a podíl krystalické fáze (X_c). Pro výpočet C_p bylo použito odvození (8).

$$C_p = \left(\frac{\partial Q}{\partial T} \right) = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right) = \left(\frac{dH}{dt} \right) / \left(\frac{dT}{dt} \right), \quad (8)$$

kde je C_p vyjádřeno jako podíl změny entalpie přeměny (ΔH) a teploty (ΔT) v čase. Tato rovnice neuvažuje další tepelné změny (*DSC, 2000*). Doba krystalizace byla stanovena dle rovnice (9) na základě rekrytalizace v průběhu chladnutí jako

$$t_c = \frac{(T_N - T_2)}{r}, \quad (9)$$

kde $T_{N,2}$ představují počáteční (nukleační) a konečnou teplotu krystalizace, r rychlost chlazení. (*Ciardelli et al., 2005*). Krystalinita (podíl krystalické fáze) vzorků byla spočtena jako podíl entalpie tání (ΔH_m) testovaného a entalpie plně krystalického PCL (139,5 J/g) dle vzorce (10). (*Ciardelli et al. 2005*)

$$X_{(C)} = \Delta H_m / \Delta H_{m \text{ PCL}} \cdot 100 \quad (10)$$

9.11.7.1 Vliv elektrostatického zvlákňování na krystalinitu

Elektrostatické zvlákňování semikrystalických polymerů a mezi nimi i poly-ε-kaprolaktonu vede ke strukturální linearizaci. Během formování vláken část polymerních řetězců krystalizuje a formuje lamely⁴ složené z malých krystalů. Zbývající podíl řetězců tvoří amorfni fázi. Při aplikaci tření a tahového namáhání se

⁴ Lamela – destičkový útvar o tloušťce 10 nm formovaný skládáním polymerních řetězců jejich ohybem o 180° (*Běhálek, 2007*)

lamely organizují do fibril⁵ a řetězce prochází sousedícími krystalitami⁶ a tvoří malé shluky. Díky namáhání jsou řetězce orientovány převážně podél osy vláken. Lamelární struktura rozhoduje o krystalinitě vláken.

Vzhledem k rychlému odpaření rozpouštědla při formování polymerní trysky a rychlému formování struktury (~ 50 ms) vede elektrostatické zvlákňování k méně vyvinuté struktuře. Je alespoň obecným předpokladem, že rychlé odpaření rozpouštědla skokově snižuje teplotu trysky a molekuly polymeru, ač orientovány podél osy formovaného vlákna, nemají dostatek času k formování běžných krystalických struktur. Za obecný předpoklad se u semikrystalických polymerů považuje závislost počtu formovaných krystalických lamel na čase poskytnutém jejich tvorbě. Míra krystalinity nanovláken je tedy závislá na rychlosti odpařování rozpouštědla. Z tohoto obecného předpokladu se mohou vymykat některé polyestery s nižší hodnotou T_g (např. PCL), u nichž krystalizace může probíhat i po ztuhnutí vlákna. Tento jev může vést k nárůstu krystalinity při electrospinningu ve srovnání s jinými metodami výroby. (*Baji et al., 2010*)

Předmětem zkoumání tedy byl vliv podmínek elektrostatického zvlákňování na míru krystalinity formovaných nanovláken a tím i mechanické aj. vlastnosti.

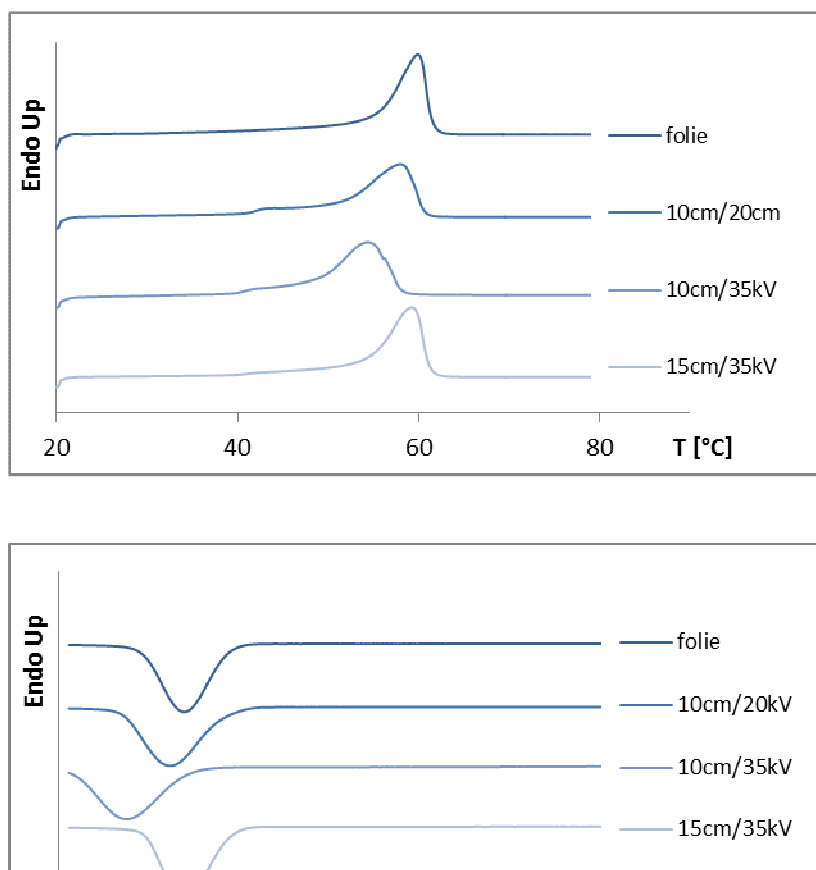
Diskuze výsledků

Jak je patrné z výsledků uvedených v tabulce 8., nejvyšší teplota tání a stupeň krystalizace byly zaznamenány u PCL fólie. Tento fakt odpovídá teorii, že elektrostatické zvlákňování obecně snižuje krystalinitu nanovláken. U jednotlivých nanovláknenných vzorků se charakteristiky lišily na základě podmínek přípravy. Při porovnání T_m je patrné, že k jejímu posuvu k vyšším teplotám dochází jednak se zvýšením zvlákňovací vzdálenosti a také snížením aplikovaného napětí. Výrazně nejnižší teplota tání byla zaznamenána u vzorku 100 mm/35 kV - konkrétně 54,4 °C. Tento posun naznačuje obsah méně kvalitních (menších) krystalů. Právě tyto krystaly se taví jako první. K tavení větších krystalů kvalitnější struktury dochází až při vyšších teplotách.

⁵ Fibrila – vláknitý útvar, v němž svírají polymerní řetězce úhel menší než 180°. V krajním případě netvoří ohyby a jsou napříměné.

⁶ Sfěrolit – polykrystalický útvar, typický pro semikrystalické polymery, skládající se z lamel. Jeho rozměry se mohou pohybovat v rozmezí mikro – až milimetrů. (*Běhálek, 2007*)

U tohoto vzorku byla také zaznamenána nejnižší teplota nukleace (T_n) a krystalizace (T_c), což naznačuje inhibici krystalizace. Překvapivě však krystalinita tohoto vzorku nebyla nejnižší. Nejnižší krystalinita byla zaznamenána u vzorku s PCL (100mm/20kV). Ačkoli vysoká teplota nukleace (T_n) naznačuje snadné zakládání nukleačních center, dosáhla krystalinita tohoto vzorku pouze 51,3 %, při době krystalizace 202 sekund. To vede k názoru, že uvedeme procesní podmínky - krátká zvlákňovací vzdálenost (100 mm) a nízké napětí (20 kV) neumožňují dostatečné porovnání krystalické struktury. Z uvedeného vyplývá, že významnou roli při formování nadmolekulární struktury nanovláken hraje zvlákňovací délka, jejíž nárůst, při aplikaci daného napět, poskytuje delší čas pro formování nadmolekulární struktury a tím dosažena vyšší krystalinita vzorku.



Obr. 13 Křivky tavení a rekystalizace PCL nanovláken .

Tab. 8 Tepelné charakteristiky PCL nanovláken naměřené metodou DSC.

Podmínky přípravy										
L	Napětí	T _m	ΔH _m	C _{pm}	T _c	T _N	ΔH _c	t _c	C _{pc}	X _c
[mm]	[kV]	[°C]	[J/g]	[J/g.°C]	[°C]	[°C]	[J/g]	[s]	[J/g.°C]	[%]
FOLIE		59,98	80,6	5,77	32,5	39,24	-77,14	163,31	5,25	57,35
150	35	59,33	75,92	5,19	32,58	39,87	-75,98	173,15	5,27	54,42
100	20	58,01	71,52	4,31	31,07	40,28	-76,56	202,52	4,54	51,27
100	35	57,44	75,21	4,62	26,82	36,32	-68,08	183,67	4,45	53,91

T_m, T_c, T_N – teploty tání krystalizace, nukleace;

C_p – měrná tepelná kapacita (m – tání, c – krystalizace) ;

ΔH – entalpie , t_c – doba krystalizace;

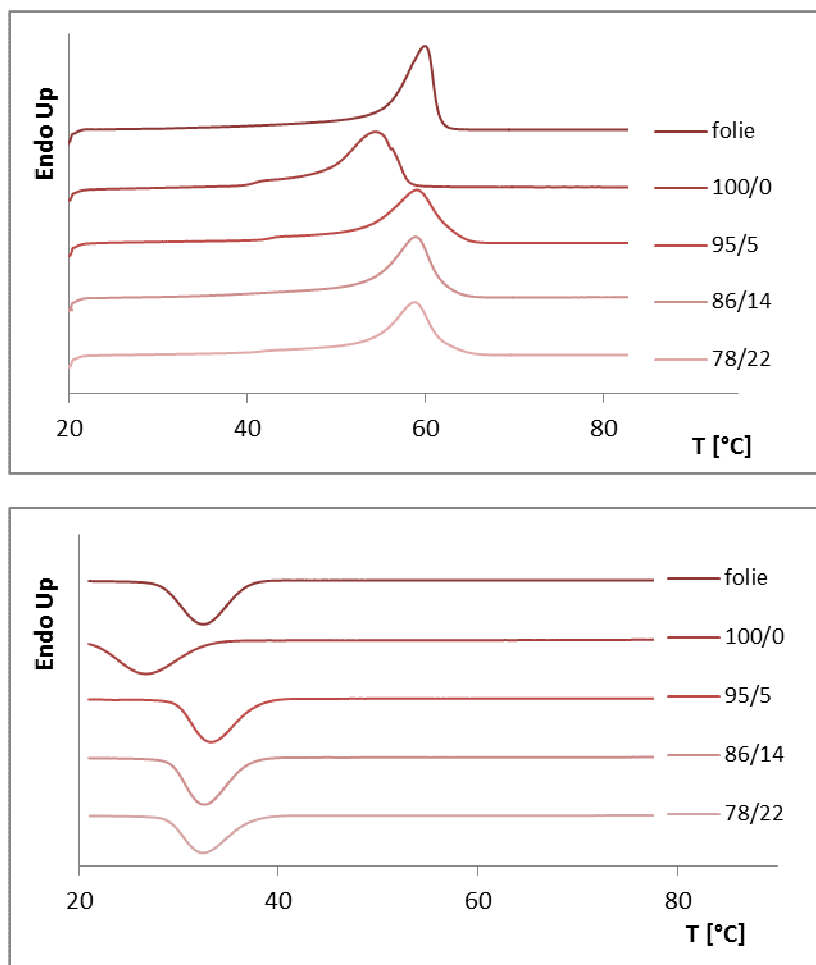
X_c – krystalinita (celkový hm. Podíl krystalické fáze)

9.11.7.2 Vliv podílu kolagenu na krystalinitu nanovláken

DSC analýzou byl také testován vliv podílu kolagenu (při shodných podmínkách přípravy) na krystalinitu nanovláken s různým poměrem PCL/K. Zkoumán byl také vliv na nukleaci, neboť u některých přírodních polymerů (např. škrob, dextran) byl ve směsi s PCL prokázán nukleační efekt. Takové výsledky uvádějí například *Ciardelli et al., 2005*. Jejich účinek se projevuje usnadněním počátku krystalizace, zvýšením počtu nukleačních center a zjemněním krystalické struktury při uchování míry krystalinity vzorku. Tento efekt se projevuje zvýšením teplot při rekrystalizaci (T_N a T_C). (DSC, 2000)

Tab. 9 Tepelné charakteristiky PCL/K2 nanovláken naměřené metodou DSC.

Vzorek	Složení PCL/K	T _m	ΔH _m	C _{pm}	T _c	T _N	ΔH _c	t _c	C _{pc}	X
		[°C]	[J/g]	[J/g.°C]	[°C]	[°C]	[J/g]	[s]	[J/g.°C]	[%]
1	100/0	54,44	75,21	4,62	26,82	36,32	-68,08	183,67	4,45	53,91
2	95/5	59,02	75,01	3,64	33,25	41,96	-69,9	181,07	4,54	53,77
3	86/14	58,93	74,52	3,26	32,59	40,46	-71,72	184,67	4,99	53,42
4	78/22	58,86	62,89	3,43	32,49	41,308	-61,71	186,77	3,96	45,08



Obr. 14 Křivky tavení PCL/K2 nanovláken.

Diskuze výsledků

Jak je patrné z tabulky 9, vede přidavek kolagenu ke zvýšení teploty tání (T_m) oproti čistým PCL nanovláknům, vytvořeným při shodných procesních podmínkách. Při vzájemném porovnání bikomponentních nanovláken pak došlo k opětovnému systematickému snižování T_m s rostoucím podílem kolagenu. Stejný trend byl zaznamenán i u teploty krystalizace (T_c). U všech vzorků s obsahem kolagenu byla také zaznamenána vyšší teplota nukleace v porovnání s čistým PCL. Kromě toho byl u testovaných vzorků zaznamenán systematický pokles krystalinity a nárůst doby krystalizace s rostoucím podílem K.

Z uvedených skutečností vyplývá, že stejně jako v případě *Ciardelliho et al.* (2005), by mohla příměs kolagenu přinášet nukleační efekt, který je patrně nejvýraznější u 5% podílu kolagenu ve vláknech. Vyšší teplota tání bikomponentních

vláken by mohla, i přes klesající krystalinitu, znamenat orientovanější nadmolekulární struktur nanovláken. V kombinaci s dobrou krystalizací, vzrůstající s podílem kolagenu, je možné předpokládat, že tento jev je způsoben méně ochotným průběhem zvlákňování. Je tedy otázkou, jestli je pravděpodobně lepší organizace způsobena přítomností kolagenu v nanovlákních nebo pouze snížením intenzity elektrostatického zvlákňování, které je do značné míry ovlivněno podílem a koncentrací kyseliny octové ve zvlákňovacím roztoku.

9.11.7.3 Mísitelnost polymerů

Při hodnocení mísitelnosti binární (bipolymerní), polymerní směsi metodou DSC obecně platí, že za nemísitelné se považují směsi, které vykazují dvě samostatné T_g a dvě T_m , které jsou považovány za nezávislé na složení směsi. Za mísitelné jsou považovány směsi vykazující závislost charakteristik na složení směsi indikované jednou hodnotou T_g a T_m . Za částečně mísitelné jsou považovány směsi vykazující dvě hodnoty pro T_g i T_m , avšak tyto hodnoty jsou závislé na složení směsi (*Mohamed et al., 2008*).

DSC křivky na obrázku 15. vykazují u čistého PCL i vzorku s podílem kolagenu vždy jeden endotermní vrchol při zahřívání (tání) s maximální hodnotou v T_m a exotermní v průběhu chlazení (rekrytalizace, T_c).

Diskuse výsledků

Jak vyplývá z výsledků měření (viz tab. 9), je zde patrná systematická závislost hodnot na podílu kolagenu. S rostoucím podílem kolagenu dochází k poklesu T_m i T_c a klesá krystalinita vzorků. Na základě těchto znalostí, ačkoli není znám vliv podílu na T_g , lze předpokládat plnou, či alespoň částečnou mísitelnost PCL a kolagenu a interakce mezi nimi. Tento předpoklad by však musel být potvrzen i jinou metodou.

9.12 Závěry kapitoly A

Metodou elektrostatického zvlákňování se s využitím různých směsí rozpouštědel podařilo získat sérii nanovláknenných vrstev různé morfologie a s různými podíly obou složek PCL a kolagenu typu I (K1, K2). V průběhu práce byly nalezeny vhodné postupy mísení v závislosti na použitých rozpouštědlech a pH roztoků. Ty umožnily elektrostatické zvlákňování nanovláken s prokazatelným podílem kolagenu ve hmotě. Účinnost těchto postupů byla prokázána jejich úspěšným využitím k získání PCL/K nanovláken i s jinými roztoky polykaprolaktonu (PCL). (Rysová, 2011) Za nejvýznamnější výsledky může být považováno dosažení vysokého hmotnostního podílu kolagenu v nanovlákněch – až 36% při současném průměru nanovláken 84 nm. Případně průměru 68 nm při podílu kolagenu 14%. Tyto struktury, stejně jako ostatní dosažené morfologie, mají potenciál pro konstrukci nosných struktur (scaffoldů) pro tkáňové inženýrství (Rysová *et al.*, 2011a).

Přítomnost kolagenu v nanovláknenných vrstvách byla prokázána prostřednictvím FTIR analýzy. Ta vykazala závislost hloubky vrcholů spojených s vibracemi I. a II. amidu na podílu kolagenu. Vzhledem k omezené citlivosti této metody však nebylo možné průkazně prokázat přítomnosti těchto vibrací u vzorků s hmotnostním podílem kolagenu pod 10%. Přesné prokázání kvantity kolagenu v PCL/K nanovláknenných vrstvách by bylo vhodné provést jinou metodou – např. kapalinovou chromatografií. Při práci byla používána koncentrace AA doporučené zdrojem – tedy 86%. V takto kyselém prostředí může docházet k denaturaci a rozpadu trojitě šroubovice kolagenu. Jak uvádějí Liu *et al.* (2010), má kyselina octová ve srovnání s běžně používaným HFIP menší denaturační účinek (40% obj.). Případná denaturace kolagenu a její míra by měla být předmětem dalšího zkoumání.

DSC analýzou se podařilo prokázat snižování krystalinity nanovláken s rostoucím podílem kolagenu. Takto byl potvrzen vliv přítomnosti kolagenu na rychlost degradace a s pravděpodobně i mechanické vlastnosti. Metodou DSC byla také potvrzena přinejmenším částečná mísitelnost těchto polymerů. Pro získání přesnějších výsledků by bylo opakování měření a ověření vlivu příměsi kolagenu na T_g. Výsledky FTIR a DSC analýz naznačují možnost interakcí mezi řetězci kolagenu a PCL, zřejmě prostřednictvím vodíkových můstků nebo iontových interakcí. Pro potvrzení této domněnky by však bylo nutné další zkoumání – například metodou XPS.

B. Povrchová funkcionalizace

Cílem této kapitoly bylo ověření realizovatelnosti a účinnosti i jiné metody funkcionalizace nanovláken, než je elektrostatické zvlákňování polymerních směsí. Při využití shodných biopolymerů jako v kapitole A byl získán materiál umožňující srovnání z hlediska požadavků tkáňového inženýrství (viz kapitola C).

Jako další způsob přípravy funkcionalizovaných nanovláknenných vrstev s obsahem kolagenu byla zvolena metoda tzv. polymeračního roubování. Ta umožňuje kovalentní navázání požadované látky na povrch substrátu při současném zachování jeho struktury a hmotových vlastností a je tedy velice vhodná pro tvorbu scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Výhody této metody jsou její variabilita, možnost využití široké škály substrátů i roubovaných biomolekul (*Gopal et al., 2007*).

K iniciaci vazebných míst nutných ke vzniku kovalentních vazeb mezi substrátem a biomolekulami byl použit RF (vysokofrekvenční) plazmatický výboj za sníženého tlaku. Použitá aparatura náleží Katedře materiálů FS TUL.

9.13 Příprava vzorků

Celý proces polymeračního roubování se skládá ze tří kroků: (1) tvorby nosného substrátu, (2) iniciace roubování výboji plazmatu a (3) samotného roubování. To probíhá při smočení substrátu s iniciovanými vaznými místy v roztoku vázané bioaktivní látky. Tou je v tomto případě kolagen (typ I). Všechny kroky byly provedeny při pokojové teplotě.

9.13.1 Příprava substrátu

Substrát pro plazmatické roubování byl připraven elektrostatickým zvlákňováním na tyčkové aparatuře. Jako nosný substrát byla použita poly- ϵ -kaprolaktonová (PCL) porézní mikrovláknenná vrstva o průměru vláken $1.4 \pm 1.5 \mu\text{m}$ (viz obr. 16 a). PCL byl pro substrát zvolen vzhledem k jeho širokým možnostem funkcionalizace (*Xu et al. (2010); Yoo et al. (2009)*) a také zajímavosti silně porézního povrchu vláken pro TI řady tkání. Vzhledem k možným nestabilitám výboje a dalším požadavkům na

plazmaticky upravovaný materiál, byla připravena vlákenná vrstva o plošné hmotnosti 110 g/m^2 . Podmínky elektrostatického zvlákňování jsou uvedeny v tabulce 10. Připravená vrstva byla zbavena podkladu (PP netkaná textilie) a rozdělena na čtverce o rozměrech $80 \times 80 \text{ mm}$ tak, aby bylo možné umístit a uchytit vzorky na elektrodu plazmové aparatury.

Tab. 10 Podmínky přípravy PCL substrátu.

Koncentrace roztoku	[hm.%]	18
Rozpouštědlo	[obj.%]	THF/DMSO (90/10)
Napětí	[kV]	35
Vzdálenost kolektor-tyčka	[cm]	13
Relativní vzdušná vlhkost	[%]	59
Teplota	[°C]	22

9.13.2 Podmínky plazmatické iniciace

Při iniciaci povrchu substrátu byly zachovány konstantní podmínky popsané v tabulce 11. Při těchto podmínkách byly na vzorky substrátu aplikovány dvě různé atmosféry (reakční plyny – kyslíková (O_2) a vzdušná. Jak již bylo uvedeno, volba atmosféry hraje při plazmatických úpravách materiálu zcela zásadní roli – ovlivňuje typ excitovaných částic, jejich množství a tedy účinek na povrch substrátu, který zcela zásadně ovlivňuje chemii povrchu a tím i jeho biokompatibilitu a bioadhezi (*Lee et al., 2008*).

Tab. 11 Podmínky plazmatické iniciace substrátu.

Atmosféra	O_2	vzduch
Barva výboje	modrá	růžová
Průtok plynu [sccm]	60	
Tlak v komoře [Pa]	100	
Příkon [W]	25	
Impedance [Ω]	1	
Doba úpravy [min]	5	

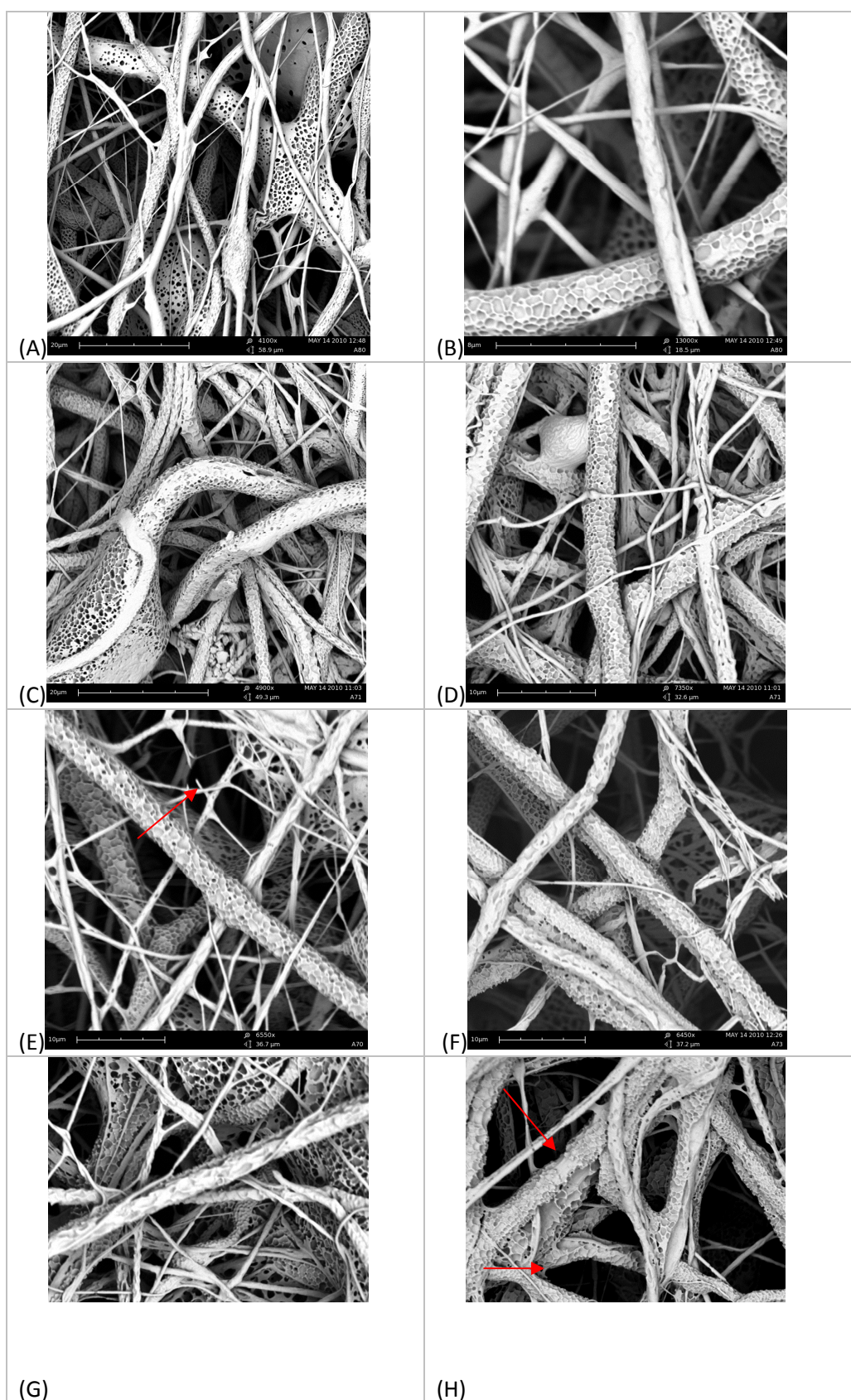
9.13.3 Podmínky smáčení

Pro polymerizační roubování kolagenu typ I (kuřecí běháky) na porézní PCL substrát bylo připravena série roztoků o koncentraci 0,3 – 3 % (hm.). Jako rozpouštědlo byla využita, pro tkáňové inženýrství vhodná, kyselina octová (AA). Její koncentrace ve smáčecích roztocích se pohybovala mezi od 16% do 30% (obj.). Před samotným pokusem byl testován vliv koncentrace AA na PCL substrát při pouhém smáčení. Vzhledem k výsledkům byly zvoleny pro smáčecí roztok zvoleny její méně koncentrované roztoky, které sice prodlužují dobu rozpouštění užívaného kolagenu, ale nebyl u nich zaznamenán okamžitý negativní dopad na mechanické vlastnosti substrátu. Kromě práce s těmito roztoky byly také provedeny okrajové pokusy s roztoky vysoce čistého kolagenu typu I (kryší ocásky) rozpuštěného v 0,2% AA. Některé z výsledků jsou uvedeny v *Rysová (2010)*.

9.14 Funkcionalizované vrstvy

Vzorky PCL byly po naroubování řetězců kolagenu vyhodnocovány dvěma metodami. Prostřednictvím elektronové mikroskopie (SEM) byl zkoumán vliv procesních podmínek plazmatické iniciace a také vliv podmínek roubování při smáčení substrátu. Zkoumán byl především případný negativní dopad na strukturu vrstvy. Metoda Fourierovy transformační infračervené spektroskopie (FTIR) byla použita k ověření přítomnosti kolagenu na substrátu a o prokázání vlivu jednotlivých parametrů na jeho množství.

Při ověřování přítomnosti kolagenu ve vzorcích bylo nezbytné vyloučení kolagenu, který není na povrchu substrátu kovalentně vázán. Z tohoto důvodu byly funkcionalizované vzorky před analýzou podrobeny vymývání v destilované vodě po dobu 5 dnů. V průběhu vymývání byla voda měněna v intervalu 12 hodin. Tím bylo zabráněno zpětnému usazení uvolněného kolagenu. Tento postup je opodstatněný také vzhledem k tomu, že běžnou praxí před testy tkáňového růstu je několikadenní vymývání reziduí rozpouštědel. Kromě toho poskytl představu o obsahu kolagenu ve vrstvách již připravených pro testy tkáňového růstu.



Obr. 15 SEM snímky PCL substrátu (A) a (B) a vzorků PCL po funkcionalizaci kolagenem za podmínek (C) $O_2/3/16/30^*$, (D) $O_2/3/16/30/VYM$, (E) $VZ/3/16/10/VYM$, (F) $VZ/3/16/30/VYM$, (G) $O_2/3/30/30/VYM$, (H) $VZ/3/30/30/VYM$.

*atmosféra/koncentrace K [hm.%]/koncentrace AA [hm.%]/doba smáčení [sec]/další úprava

9.14.1 Struktura funkcionalizovaných vrstev

Pomocí snímků z elektronového mikroskopu byly zdokumentovány jednotlivé vlivy podmínek úpravy na výsledný vzhled funkcionalizovaných vláken. Prvním významným zjištěním bylo zachování porézní vlákenné struktury a mezivláknenných pórů. U vzorků před vymytím nevázaného kolagenu, bylo pozorováno mírné zanesení vláknenných pórů (obr. 15 (C)). Tento jev byl vymytím odstraněn.

Jako parametry ovlivňující vzhled a vlastnosti vrstvy byly stanoveny (i) reakční plyn při plazmatické iniciaci, (ii) doba smáčení a (iii) koncentrace rozpouštědla ve smáčecím roztoku.

Diskuse výsledků

V případě plazmatické iniciace byl zaznamenán výraznější dopad použití vzduchu ve srovnání s atmosférou kyslíkovou (obr. 15(D/F), (G/H)). V případě vzduchu došlo k patrnějšímu poškození vláken projevujícímu se zvýrazněním jejich porozity. Tento jev je možné vysvětlit obsahem plynů jako dusík (N_2), argon (Ar) a vodík (H_2), které se v praxi povrchových úprav plazmatem využívají nejen k zlepšení smáčivosti a aktivaci povrchu, ale také k jeho naleptávání (*Lee et al., 2008*).

V případě koncentrace rozpouštědla a doby smáčení byl zaznamenán podobný destrukční efekt. Tedy s rostoucí koncentrací a dobou smáčení bylo pozorováno narušování vláknenných pórů a také přehnutí a praskání jemnějších vláken (obr. 15 (E, H)). Samozřejmě tyto jednotlivé parametry se mezi sebou kombinují.

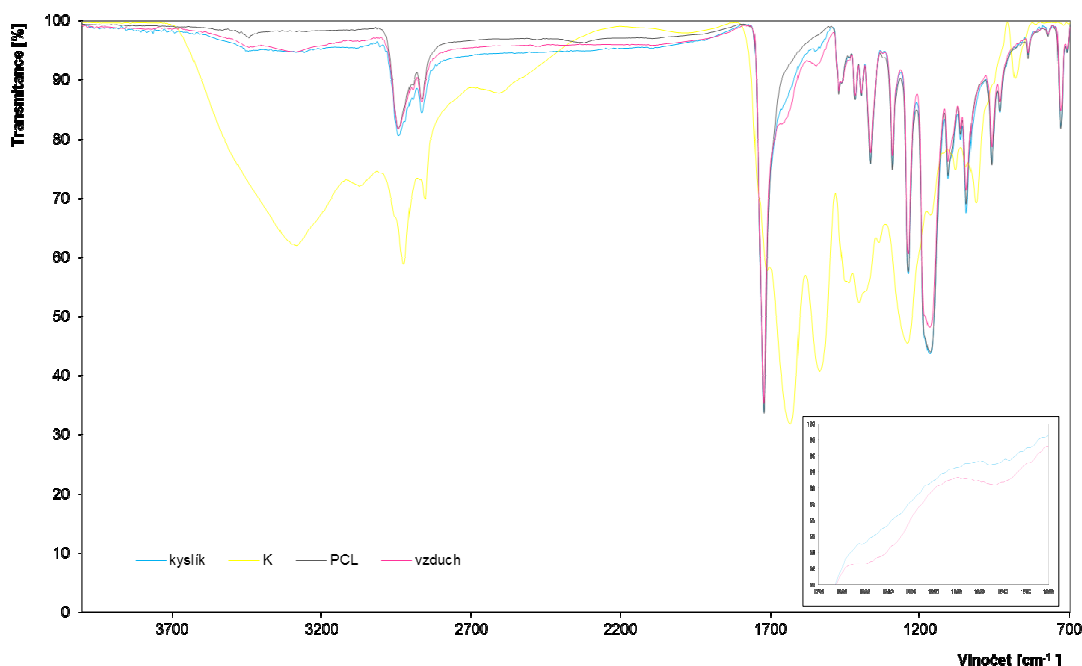
9.14.2 Účinnost funkcionalizace

Účinnost funkcionalizace a vliv jednotlivých parametrů byly hodnoceny na základě prokázaného množství kolagenu. Vzhledem k testování FTIR analýzou až po odstranění přebytečného vymýváním, lze předpokládat, že zbylé makromolekuly kolagenu byly na povrch PCL substrátu kovalentně navázány. Při vyhodnocování přítomnosti a množství kolagenu na vzorcích byl použit shodný postup jako v kapitole A. Opět je však nutné poznamenat, že FTIR analýza je zde využita pouze k orientačnímu stanovení kvantity, nikoli jejímu přesnému stanovení.

Diskuse výsledků

Vliv reakčního plynu

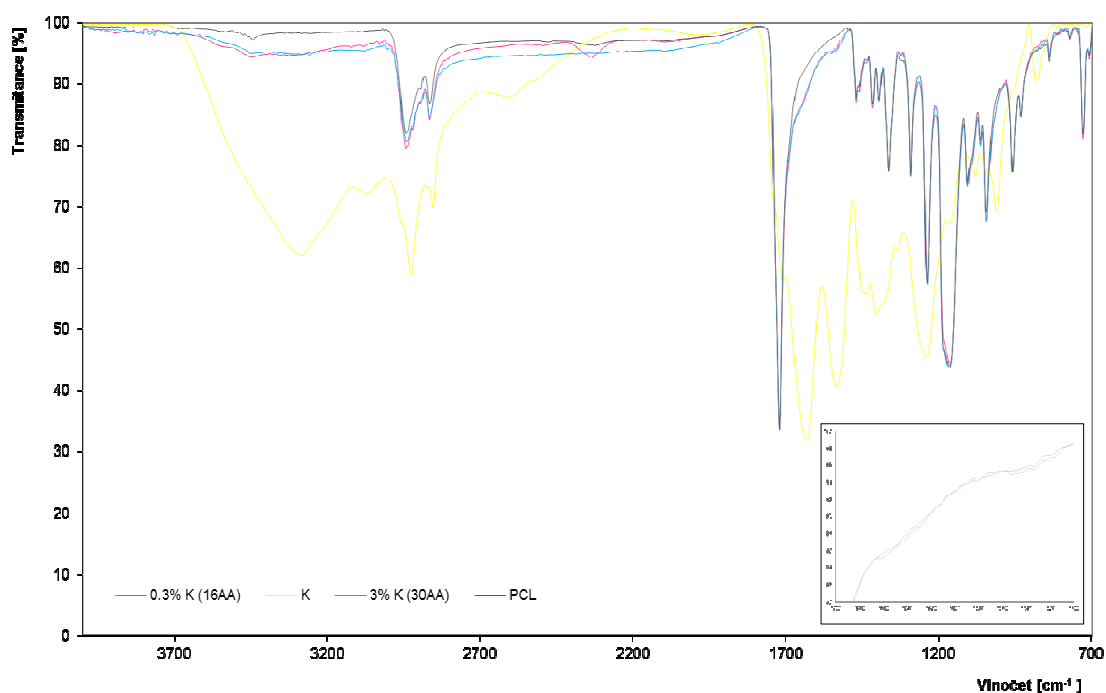
Vyšší intenzita typických píků amidů I. a II. v oblasti $1653 - 1540 \text{ cm}^{-1}$ byla zaznamenána u vzorků upravených ve vzduchu jako reakčním plynu (viz graf 6). Tyto vibrace naznačují, že úprava ve vzdušné atmosféře umožňuje intenzivnější iniciaci a tedy tvorbu vyššího počtu aktivních míst nezbytných pro kovalentní navázání řetězců kolagenu.



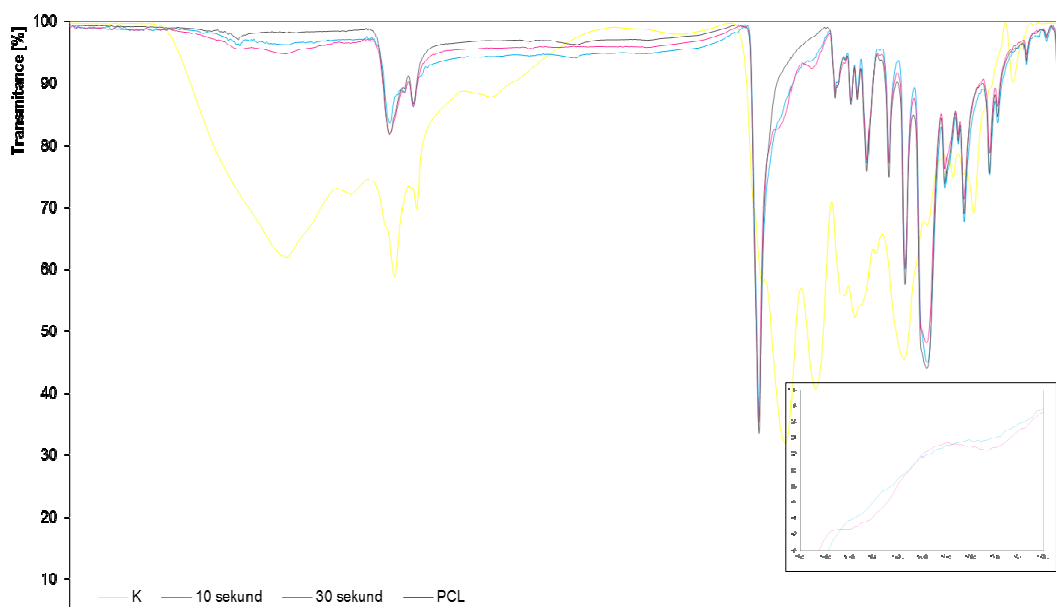
Graf 6. FTIR spektra prokazující vliv atmosféry aplikované při plazmatické iniciaci na její účinnost. Vlnočty neupraveného PCL, kolagenu a vzorků upravených při shodných podmínkách: smáčení v roztoku 3% K2 po dobu 30 s.

Vliv koncentrace smáčecího roztoku

Při posuzování vlivu koncentrace kolagenu ve smáčecím roztoku bylo prokázáno, že velmi malá koncentrace kolagenu ve smáčecím roztoku je postačující k tomu, aby došlo k zaplnění všech plazmaticky vytvořených aktivních míst. Jak ukazuje graf 7, již 0,3% (hm.) roztok je postačující a množství kolagenu navázaného na povrch PCL z takového smáčecího roztoku je po vymývání shodné s hodnotami dosaženými roubováním smáčením v roztoku o koncentraci kolagenu desetkrát vyšší.



Graf 7. FTIR spektra při různé koncentraci smáčecího roztoku. (a) PCL substrát, (b) kolagen typ I C(I), vrstva po iniciaci plazmou v O_2 atmosféře, roubování smočením (c) v 0,3% roztoku K2 v 16% AA (30 sec), (d) smočení v 3% roztoku K2 v 30% AA (30 sec).



Graf 8. FTIR spektra dokumentující vliv doby roubování na množství kolagenu navázaného na substrát. Neupravený substrát (PCL), kolagen (K), vrstvy připravené plazmatickou iniciací ve vzduchu a roubované shodně v 3% roztoku K2(30AA).

Vliv doby smáčení

Obečným předpokladem týkajícím se doby roubování po předchozí iniciaci je, že i velice krátké expoziční časy postačují k zaplnění všech aktivních míst. Tento předpoklad potvrzuje také tato práce. Intenzity vibrací I. a II. amidů v oblasti 1653 – 1540 cm^{-1} (viz graf 8) jsou velice blízké. Při porovnání výsledků dosažených smáčením po dobu 10 a 30 sekund se zdá, že intenzivnější vibrace ve zkoumané oblasti vykazuje 2 vzorek (30 s). Tyto výsledky v porovnání s delší dobou smáčení - až do 10 minut (*Rysová, 2010*) potvrzují, že k zaplnění všech aktivních míst dochází v průběhu prvních 30 sekund roubování. Při užití delších expozičních časů nebylo ve srovnání s expozicí po dobu 30 sekund dosaženo prokazatelného zvýšení podílu kolagenu kovalentně vázaného na povrch PCL vláken (*Rysová, 2010 a Rysová et al., 2011b*).

9.15 Závěry kapitoly B

Za zásadně pozitivní výsledek této kapitoly může být považováno dosažení a prokázání funkcionalizace PCL porézních mikrovláken prostřednictvím polymeračního roubování iniciovaného plazmatickou úpravou. Nespornou výhodou tohoto postupu je dosažení kovalentního navázání kolagenu bez nutnosti využití tzv. mostů, jež uvádějí například *Cheng and Teoh (2004)* a *Xu et al. (2010)*. Vazba mezi substrátem a kolagenem a substrátem jsou zřejmě realizovány prostřednictvím -OH skupin formovaných na povrchu substrátu účinkem plazmatické úpravy (*Cheng and Teoh, 2004*) a bočními skupinami kolagenu, které se nepodílejí na vodíkových vazbách uvnitř jeho molekuly (-COOH a -NH₂). Vzhledem k polyelektrolytické povaze kolagenu v kyselém prostředí a účinkům plazmy na povrch PCL může být kolagen na substrát vázán i iontově. (*Chen et al., 2007*) Pro prokázání přesného mechanismu tvorby vazeb by bylo nutné ověření například metodou XPS (rentgenová fotoelektronová spektroskopie)..

Porovnáním vlivu jednotlivých procesních podmínek na účinnost funkcionalizace byly zvoleny optimální podmínky úpravy. Jako účinnější byla stanovena iniciace využívající vzduch jako reakční plyn. Doba postačující k zaplnění iniciovaných vazných míst pak byla stanovena na 30 sekund. Vzhledem k mírnému destrukčnímu účinku je vhodné při použití těchto procesních podmínek pracovat s nižší koncentrací kyseliny octové ve smáčecím roztoku. Tyto závěry mohou být využity pro další optimalizaci procesu. Dalším krokem by mohlo být testování této metody na jiné PCL struktury a dále ověření možností její realizace a účinnosti při atmosférickém tlaku.

Povrchově funkcionalizované vrstvy i celá metoda by mohly být, vzhledem k omezeným rozměrům vzorků, využity pro funkcionalizaci malých implantátů a scaffoldů.

C. Testy tkáňového růstu

Cílem této kapitoly je ověřit využitelnost připravených nanovláknenných funkcionalizovaných materiálů jako scaffoldů pro tkáňové inženýrství vybrané tkáně. Podstatnou součástí tohoto úkolu bylo vyšetření vlivu jednotlivých parametrů – metody přípravy, morfologie vrstvy a obsahu kolagenu – na proliferaci buněk a na základě získaných dat stanovit další postup ve vývoji uvedených materiálů.

Jak již bylo uvedeno, kolagen typu I představuje zhruba 90% všech kolagenů v živých organismech. Tento fakt a jeho vynikající bioaktivita umožňují využití materiálů s jeho obsahem v tkáňovém inženýrství řady tkání. Polykaprolakton (PCL) scaffoldu propůjčuje dobré mechanické vlastnosti a prodlužuje dobu jeho fyziologické degradace. Jak uvádí literatura (*Kubínová and Syková, 2010*), byly oba tyto materiály testovány pro náhradu (tkáňové inženýrství) řady pojivových tkání včetně kostí. Zdroje, např. *Stevens and George (2005)*, také uvádějí pozitivní vliv nanostruktur imitujících rozměry kolagenních nanovláken (50 – 200 nm) v kosti na adhezi, proliferaci a diferenciaci osteoblastů. Z těchto důvodů byly funkcionalizované nanovláknenné vrstvy (uvedené v tabulkách 12 a 13) testovány jako nosiče pro tkáňové inženýrství kosti.

Testy tkáňového růstu byly provedeny (jsem provedla) pod vedením Mgr. Eleny Filové, Ph.D. na Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství (odd. 11) Fyziologického ústavu Akademie věd ČR. Pro testy byly použity osteoblastům podobné buňky MG-63⁷ pocházející z osteosarkomu 13letého chlapce.

9.16 Testované vzorky

Na buněčný růst byly testovány oba typy funkcionalizovaných vzorků – tedy nanovláknenné vzorky funkcionalizované elektrostatickým zvlákněním ze směsi biopolymerů a polymerizačním roubováním kolagenu. Výčet vybraných zástupců spolu s parametry přípravy a výslednými charakteristikami je uveden v tabulkách 12 a 13. K poměrně vysokým plošným hmotnostem testovaných vzorků je nutné

⁷ Jedna z linií lidských buněk původem z osteosarkomu (maligní nádor kosti). Vyskytuje se především v metafýze dlouhých kostí. (*Pautke et al., 2004*)

podotknout, že bylo nezbytné připravit nanovláknennou vrstvu dostatečné tloušťky, která umožní sejmutí vrstvy z podkladové textilie (spun-bond, PP). Ačkoli se plošná hmotnost nanovláknenných vrstev běžně pohybuje v rozmezí 0,5 až 5 g/m² (Lev *et al.*, 2010), mají vzorky testované v této kapitole plošnou hmotnost minimálně 13,1 g/m². Jedná se o minimální plošnou hmotnost nutnou pro zaručení jejich sejmutí z podkladu a manipulaci s nimi. Vyšší hmotnosti než 23,5 g/m² nemohly být, vzhledem k omezenému množství kolagenu, připraveny. Vysoká plošná hmotnost neupravených vrstev PCL a plazmaticky funkcionalizovaných vzorků, k jejichž tvorbě byly následně využity, byla požadována vzhledem k nestabilitám výboje při plazmatické úpravě. Plošná hmotnost přesahující 100 g/m² v takovém případě umožňuje soudržnost vzorku.

Tab. 12 Seznam vzorků funkcionalizovaných zvlákněním ze směsi biopolymerů testovaných na proliferaci buněk MG-63.

Vzorek	PCL		Kolagen		Podíl složek [%hm]	Průměr* [nm]	Plošná hmotnost [g/m ²]
	Koncentrace [%hm.]	Rozpouštědlo 9/1 [%obj]	Typ	Koncentrace c _{K2} [%hm]			
A	18	THF/DMSO	–	–	100/0	413±477	112
B		THA/AA	–	–	100/0	170±70	72
C		THF/AA	K2	3	86/14	75±32	16
D		THF/DMSO	K2	3	86/14	116±28	13
E			K2	5	78/22	124±26	18
F			K1	99.6/0.4	330±239	23

* Použita odlišná molekulová hmotnost PCL (M_n 45,000). Průměry vláken jsou tedy nižší ve srovnání s hodnotami uvedenými v kapitole A. (Průměr ± SD)

Tab. 13 Seznam vzorků funkcionalizovaných plazmatickým roubováním polymeru testovaných na proliferaci buněk MG-63.

Vzorek	Substrát	Reakční plyn	Smáčecí roztok			Doba smáčení [s]	Průměr vláken [nm]	Plošná hmotnost [g/m ²]
			Koncentrace c _K [%hm]	Typ kolagenu	Koncentrace c _{AA} [%obj]			
G	PCL (vzorek A)	O ₂	–	–	–	30	413 ± 477	112
H		VZ	–	–	–			
I		O ₂	0,3	K2	16			
J		O ₂	3	K2	30			
K		O ₂	3,75*	K1	0,02**			
L		VZ	3	K2	30			
M		VZ	3,75*	K1	0,02**			

* Koncentrace [mg/ml]; ** N (normalita).

9.17 Příprava vzorků pro testy

Příprava vzorků před samotnou kultivací buněk byla provedena v několika krocích:

- (i) odstranění reziduí rozpouštědel,
- (ii) úprava vzorků do formy vhodné pro kultivaci a
- (iii) sterilizace.

Každý z těchto kroků hraje významnou roli a nevhodná volba metody či míry úpravy může negativně ovlivnit výsledky následných testů.

Odstranění reziduí rozpouštědel bylo provedeno vymýváním v deionizované vodě. Každý vzorek byl spolu s podkladovou textilií stočen do ruličky a umístěn do sterilní kádinky o objemu 500 ml naplněné deionizovanou vodou o vodivosti nižší než $0,01\mu\text{S}/\text{cm}$ ⁸. Vzorky v uzavřených kádinkách byly umístěny na laboratorní třepačku a při soustavném horizontálním pohybu vymývány po dobu 3 dnů⁹. Výměna vody byla prováděna v intervalu 12 hodin. Po vymytí a vysušení vzorků při pokojové teplotě byly tyto zbaveny podkladové textilie, rozděleny na čtverce 15 x 15 mm a umístěny do 24 - komorových kultivačních nádob s úchytným systémem CellCrownTM24 (fa Scaffdex). Vzhledem k obtížné manipulaci s nanovlákněným materiálem byla využita pouze těla úchytného systému bez upevňovacích kroužků. Těmi byly vzorky přitlačeny ke dnům kultivačních komůrek, čímž vznikla kultivační plocha $0,79\text{ cm}^2$ na komůrku. Tímto postupně byly připraveny 3 kopie jednoho vzorku na každý testovací den plus vzorky pro doprovodné testy a barvení. Sterilizace vzorků byla provedena radiačně – gama zářením o hodnotě dávky 25 kGy.

9.18 Testování - kultivace buněk

Kultivace buněk byla provedena stacionárně¹⁰ při teplotě 37°C, 5% koncentrace CO₂ v atmosféře a nasycené vlhkosti vzduchu. Jako kultivační medium bylo použito Dulbeccovo modifikované Eaglovo medium (DMES) s přídavkem 10% fetálního bovinního séra (FS). Buňky MG-63 byly nasazeny v počtu $60 \cdot 10^3$ na jednu komůrku –

⁸ Musí odpovídat normám týkajícím se vody pro speciální účely – ČSN ISO 3696, příp. NCCLS a ASTM.

⁹ Doba vymývání zvolena na základě zkušeností Odd. 11 AV ČR s úpravou nanovlákněných materiálů.

¹⁰ Bez použití bioreaktoru, pouze umístěním kultivačních nádob do CO₂ inkubátoru.

tedy $76,372 \cdot 10^3$ buněk na cm^2 . Takto vysoký počet buněk byl použit vzhledem k prvotnímu testování materiálu. Vývoj kultury byl sledován v intervalech 24 hodin, 4 a 8 dní od nasazení buněk. V průběhu testování byly vyhodnocovány následující parametry:

- (1) počty buněk po 1, 4 a 8 dnech kultivace,
- (2) viabilita buněk v těchto intervalech,
- (3) morfologie buněk a morfologie a šíření buněčné kultury po 4 dnech kultivace,
- (4) imunofluorescence vybraných markerů po 8 dnech kultivace.

Jako srovnávací standard byla u všech vzorků využita kultivace buněk MG-63 na krycím mikroskopickém sklíčku, které obecně vykazuje dobrou buněčnou adhezi. Počty buněk byly počítány v Bürkerových komůrkách. Získaná data byla následně využita ke konstrukci růstových křivek a výpočtu viability. Ta byla stanovena jako podíl živých z celkového počtu buněk. Statistická významnost kvantitativních dat byla hodnocena testem ANOVA se Student-Neuman-Keulsovou metodou (software SigmaStat, Jandel Corporation, USA). Za významnou byla považována hodnota $p \leq 0,05$. Morfologie a šíření buněčné kultury po 4 dnech kultivace byly zkoumány fluorescenční mikroskopií s využitím barviva Alexa Fluor®488¹¹ a dalších. V osmém dni byla pomocí konfokálního mikroskopu imunofluorescenčně vyhodnocována exprese alkalické fosfatázy (ALP) a osteokalcinu (OC). Jak ALP, enzym indukující mineralizaci a kalcifikaci kosti, tak OC, kostní glykoprotein podílející se na mineralizaci kostní tkáně, se využívají jako markery diferenciací kostních buněk.

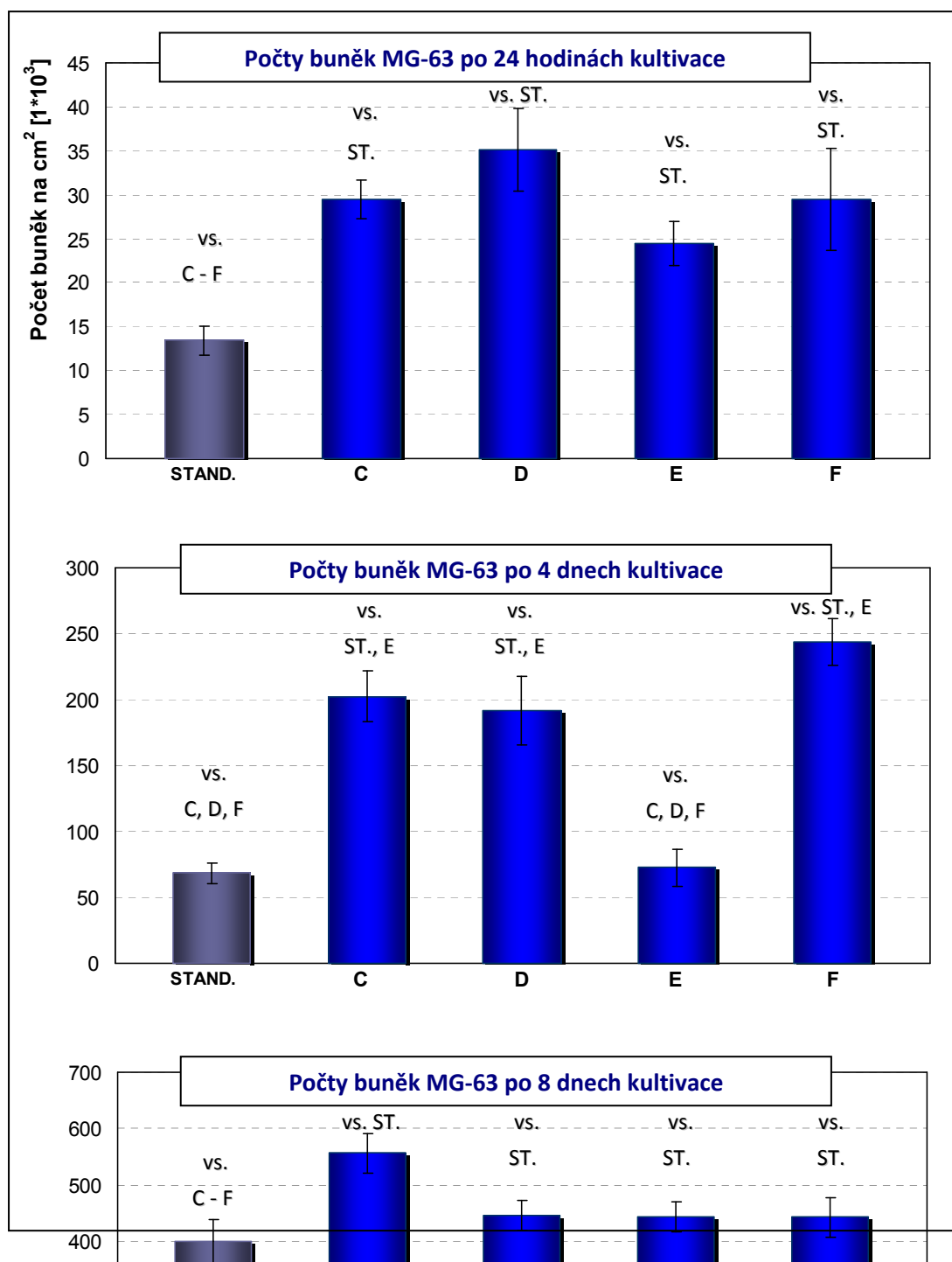
Konkrétní postupy získávání dat, použité chemikálie a postupy barvení použité při jednotlivých testech jsou uvedeny v příloze 8.

Diskuse výsledků

Hned v počátku je nutné uvést významné rozdíly ve výsledcích dosažených při kultivaci buněk MG-63 na vzorcích připravených elektrostatickým zvlákňováním směsí biopolymerů a vzorcích neupraveného polykaprolaktonu (PCL) a PCL

¹¹ Fluorescenční barvivo barví cytoplazmu a membránu buněk zeleně, excitační maximum 495 nm, emisní maximum 519 nm.

plazmaticky funkcionalizovaného. Vzhledem k nízkým počtům adherovaných buněk a jejich nízké viabilitě, nebylo u některých z těchto vzorků provedeno počítání buněk v



Graf 9 Počty buněk MG-63 na cm^2 na nanovláknenných vzorcích ze směsi biopolymerů (C, D, E, F) a standardu (STAND.) po 24 hodinách, 4 a 8 dnech kultivace. (Průměr \pm S.E.M.; statistická významnost $p \leq 0,05$ ve srovnání se vzorky ve stejném testovacím dni (ANOVA, Student-Neuman-Keulsova metoda.)

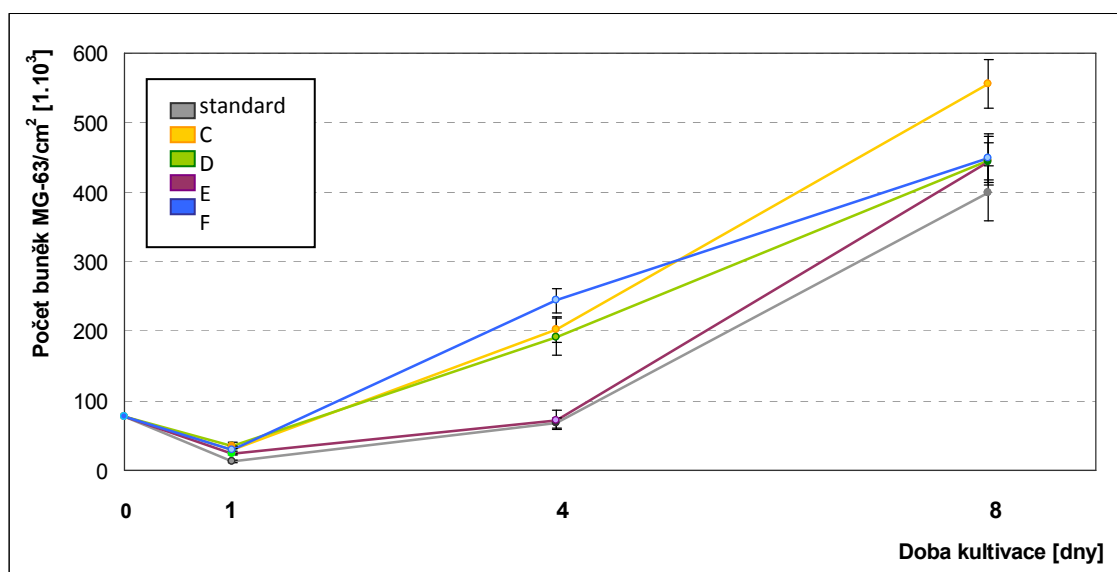
osmém dni kultivace. Vzhledem k tomu, že velice špatná počáteční adheze a viabilita byly zaznamenány jak u neupravených PCL vrstev, tak u vzorků plazmaticky funkcionalizovaných, lze předpokládat, že na vině je vysoká plošná hmotnost těchto vzorků a tedy nedostatečné odstranění reziduí rozpouštědel z nanovláknenné vrstvy. Z uvedených důvodů a vzhledem k časové náročnosti testování nebyly u těchto skupin vzorků provedeny testy morfologie buněk ani imunofluorescenční barvení. Zmíněné zkoušky byly provedeny pouze u vzorků C, D, E, F ve srovnání se standardem. Naměřená data u všech vzorků, grafická pracování závislostí a snímky z fluorescenční mikroskopie a konfokální mikroskopie imunofluorescence jsou uvedeny v přílohách 6 až 10.

Proliferace buněk

Počty buněk MG-63 (primárně) adherovaných na povrch byly po 24 hodinách kultivace výrazně vyšší v porovnání se standardem ($13,426 \pm 1,69 \cdot 10^3$) u nanovláknenných vzorků C, D, E, F. U těchto vzorků byla zjištěna také vysoká viabilita přesahující 77%. U vzorků připravených jinými metodami viabilita nepřekročila hranici 50%. Nejvyšší hustota buněčné populace byla v prvním testovacím dni zaznamenána u vzorku D (16% K2, 116 nm), to dosáhla hodnoty $35,13 \pm 4,7 \cdot 10^3$ buněk / cm^2 . Ve čtvrtém dni kultivace byla nejvyšší hustota buněk zaznamenána u vzorku F ($244 \pm 17,7 \cdot 10^3$ buněk/ cm^2). Tento fakt by mohl nasvědčovat významu čistoty určitého kolagenu nad jeho množstvím a nízkým průměrem vláken. V osmém dni kultivace byla nejvyšší hustota buněk zjištěna u vzorku C ($556,7 \pm 34,9 \cdot 10^3$ buněk/ cm^2). U ostatních vzorků ve skupině byla zjištěna téměř shodná hodnota cca $440 \cdot 10^3$ buněk/ cm^2 . Tento fakt by mohl naznačovat význam nanovláknenné struktury s rozměry pod 100 nm pro kultivaci buněk MG-63 a zároveň nabízet obsah 16% kolagenu ve vláknech jako dostatečný, neboť u vzorků s vyšším obsahem (E), nebyly v průběhu testování zaznamenány lepší výsledky.

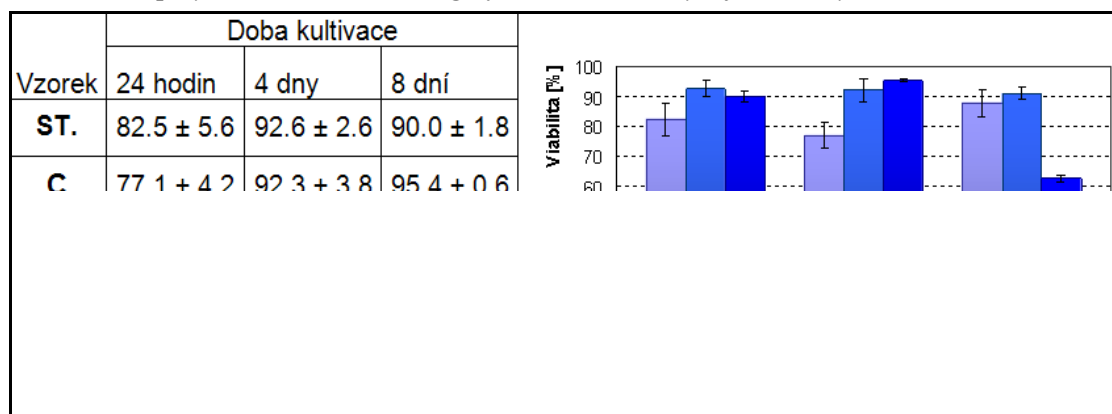
U vzorků C-F byl zaznamenán běžný průběh růstových křivek (graf 10). Tedy pokles počtu buněk v tzv. log-fázi a následný exponenciální nárůst (Log fáze) mezi 1 a 8 dnem kultivace u vzorků C a E. V případě vzorku F byl zaznamenán nárůst

logaritmický a tedy možný vliv inhibičních procesů mezi 4. a 8. dnem. Vliv vyčerpání kultivačního média byl eliminován jeho výměnou pátý den od nasazení. Je však nutné zmínit, že proliferace buněk na vzorku C mohla být podpořena kombinací nanostruktury s mikrostrukturou náhodně vzniklou při její předúpravě. Při vymývání (bez napětí) reziduí rozpouštědel došlo u vzorku C ke tvorbě struktury, která by mohla být označena jako „mikroklky“ (viz. příloha 7). Takový efekt byl pozorován pouze u tohoto vzorku a byl umožněn zřejmě právě velice nízkými průměry nanovláken.



Graf 10 Růstové křivky buněk MG-63 na nanovláknenných vzorcích připravených zvlákněním směsí biopolymerů s podílem kolagenu (C) 14%, (D) 14%, (E) 22% a (F) 2% (hm.).

Tab. 14 Viabilita buněk MG-63 na vzorcích připravených elektrostatickým zvlákněním směsí biopolymerů vs. standard a grafické zobrazení vývoje viability u C a F vs. standard.

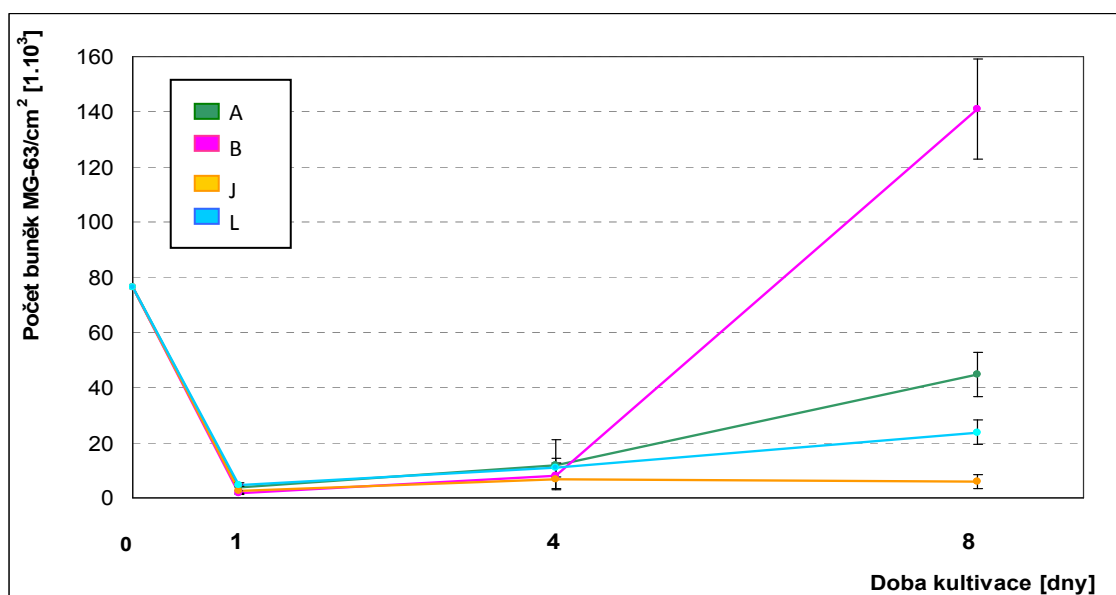


U všech nanovláknenných vzorků s obsahem kolagenu K2 (C, D, E) docházelo v průběhu kultivace k soustavnému zvyšování viability buněk. Ta v 8. dni kultivace přesáhla hranici 90% a současně i viabilitu buněk ve srovnávacím standardu (viz tab. 14). Nejvyšší viabilita byla na konci testovacího období zaznamenána u vzorku C, konkrétně $95,4 \pm 0,6\%$. Opačný trend, konkrétně pokles viability mezi 4. a 8. dnem kultivace byl pozorován u vzorku F, u kterého klesla hodnota z $91,2 \pm 1,0\%$ na $62,8 \pm 2,3\%$. Tento jev může být v kombinaci se současnou změnou strmosti růstové křivky vysvětlen dvěma způsoby. Vzhledem k nízkému obsahu kolagenu K1 ve hmotě (2%) je jednou z možných příčin poklesu proliferace jeho vyčerpání. Další možností je, vzhledem k vysoké buněčné hustotě, nástup inhibičních mechanismů (např. kontaktní inhibice) a produkce růstových inhibitorů. Vzhledem k poklesu viability je možné, že v osmém dni byla hustota buněk na vzorku F neúnosně vysoká a nastala nutnost tzv. pasážování¹².

V případě neupravených vzorků bylo možné získat data u vzorků neupraveného PCL (A, B) a plazmaticky funkcionalizovaných vzorků (J, L). U těchto vzorků bylo většinou zaznamenáno postupné zlepšování proliferace buněk MG-63 (graf 11) a současně nárůst viability buněk (viz příloha 9). V případě plazmaticky funkcionalizovaných vzorků byly vyšší hustota buněk a viabilita ($61,4 \pm 4,6\%$) v 8. dni dosaženy u vzorku K. Tento vzorek byl před funkcionalizací iniciován plazmou při využití vzduchu jako reakčního plynu. Vzhledem k výsledkům kapitoly B je tedy možné předpokládat vyšší množství kolagenu na jeho povrchu v porovnání se vzorkem J. V případě vzorku J došlo po čtvrtém dni kultivace k opětovnému poklesu počtu buněk i jejich viability. U neupravených vzorků byla v průběhu kultivace zaznamenána lepší viabilita buněk u vzorku A. 8 dní po začátku kultivace se však hodnoty viability vzorků velice přiblížily a překročily hranici 90%. V osmý den dosáhla hustota populace na vzorku B hodnoty $140,96 \pm 18,32 \cdot 10^3$ buněk /cm², zatímco na vzorku A pouze $44,7 \pm 7,97 \cdot 10^3$ buněk/cm². Tento rozdíl může být způsoben jednak rozdílnou morfologií vzorků A a B, což by potvrzovalo tezi o upřednostňování nanovláknenných struktur s nižšími průměry vláken buňkami MG-63.

¹² Po určité době se živiny v médiu vyčerpají a počet buněk stoupne na neúnosnou míru. Tehdy je nutné provést tzv. pasážování, kdy je část buněk odebrána, smíšena s novým médiem a přenesena do další kultivační nádoby. (*Kultivace, 2009*)

Dalším vysvětlením může být, vzhledem k obecně špatným výsledkům vzorků s plošnou hmotností přesahující (či blízkou) 100 g/m^2 , nedostatečná předúprava vzorků a přítomnost reziduí rozpouštědel. V případě vzorku B tedy mohlo být lepších výsledků dosaženo díky jeho nižší plošné hmotnosti a vyšší účinnosti předúpravy. Špatné výsledky plazmaticky funkcionalizovaných vzorků mohou být vysvětleny obdobně, vzhledem k tomu, že vzorek A byl použit jako substrát pro jejich přípravu. Horší výsledky proliferace a viability buněk u těchto vzorků v porovnání se substrátem mohou být způsobeny navázáním reziduí rozpouštědel při plazmatické iniciaci funkcionalizace. Tím by bylo jejich další odstraňování výrazně ztíženo. Toto zjištění potvrzuje nemalý význam podmínek přípravy vzorků a jejich předúpravy před samotnou kultivací. Možnost tohoto jevu nikoli s rezidui rozpouštědel, ale skupinami kyseliny octové použité při smáčení roztokem kolagenu, které by umožnily dosažení neutrálního pH při kultivaci se jeví nepravděpodobné. Potvrzují to velice špatné výsledky vzorků I, K a M, u nichž byly, v porovnání se vzorky J a L, použity značně nižší koncentrace.



Graf 11 Růstové křivky buněk MG-63 na nanovlákněných vzorcích (A),(B) čistého PCL o různých plošných hmotnostech a průměrech nanovláken a vzorcích porézních nanovláken funkcionalizovaných kolagenem K2 po plazmatické úpravě v reakčních plynech (J) O_2 a (L) vzduch za shodných podmínek. (Průměr \pm S.E.M.)

Morfologie buněk

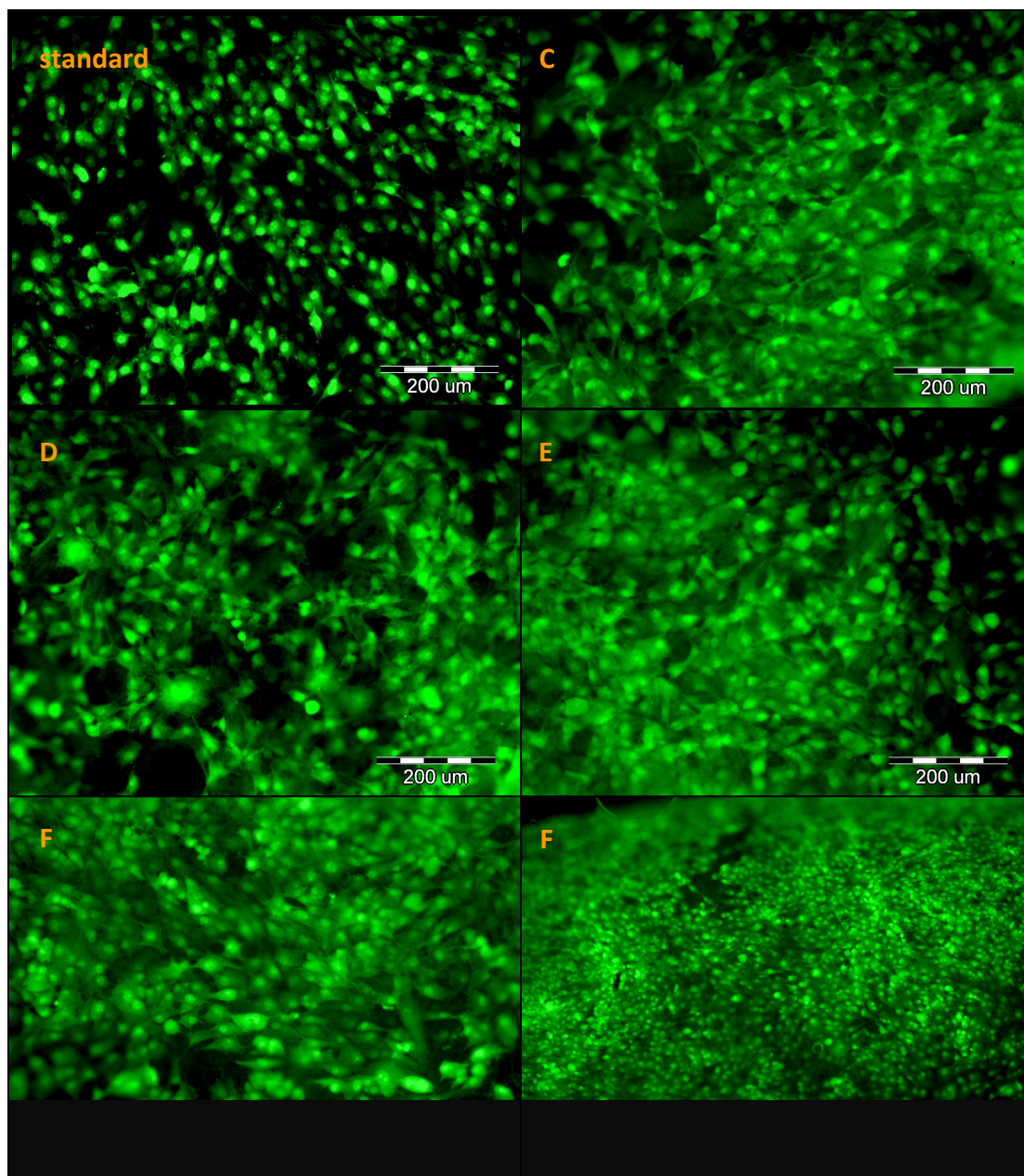
Fluorescenční mikroskopie buněčných kultur MG-63 po 4 dnech kultivace byla provedena u vzorků C, D, E a F a porovnána se standardem. U těchto vzorků byly pozorovány buňky zaujímající větší plochu ve srovnání se standardem. Vzhledem k vysokému počtu nasazených buněk a jejich dobré proliferaci byla u vzorků C – F pozorována 1. konfluentní rovnoměrná vrstva buněk a započatá tvorba vrstvy druhé (viz obr. 15). Buňky byly na povrchu vzorků orientovány náhodně.

Imunofluorescence vzorků

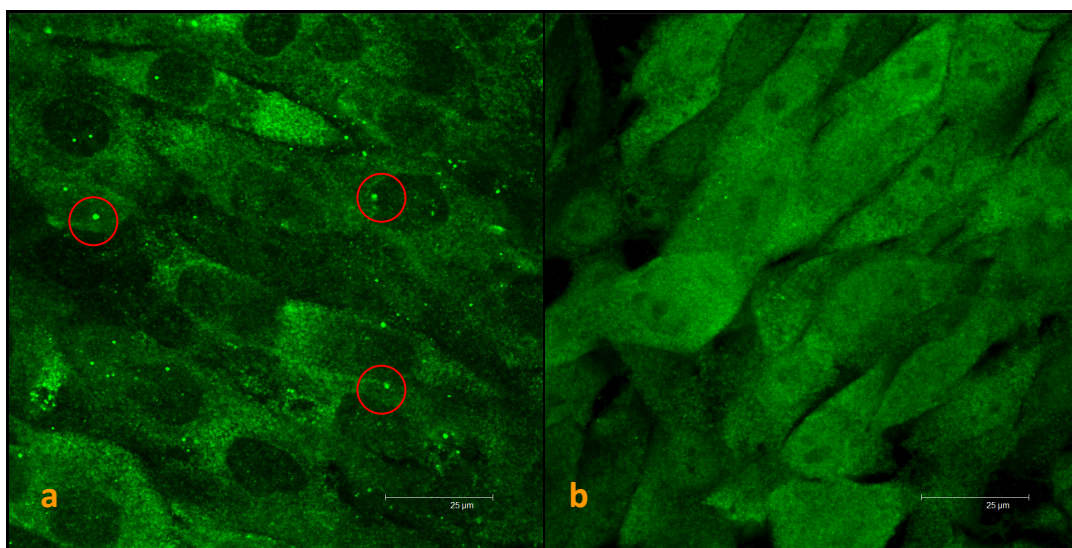
U všech testovaných vzorků (C, D, E, F) byla potvrzena přítomnost alkalické fosfatázy (ALP) a osteokalcinu (OC) v různé míře (viz příloha 10). V některých případech byla pozorována exprese látek do mezibuněčného prostoru. Alkalická fosfatáza (ALP) je enzym indukující mineralizaci a kalcifikaci kosti. Jeho aktivita je parametrem diferenciaci kostních buněk. Přítomnost ALP byla po osmi dnech kultivace pozorována ve všech testovaných vzorcích – většinou v cytoplasmě buněk. Nejintenzivnější barvení a tedy i nevyšší koncentrace ALP vykázal vzorek F. Tento fakt koreluje s výsledky proliferace buněk. MG-63 patří mezi typy buněk vykazující inverzní závislost mezi buněčným růstem a aktivitou ALP in vitro. S nárůstem proliferace buněk aktivita ALP klesá. (*Liu et al., 2004*) U vzorku F je tedy pozorován opačný efekt, kdy při rychlosti poklesu proliferace exprese ALP vzrostla (ve srovnání s ostatními vzorky). U všech vzorků včetně standardu byla pozorována exprese ALP do mezibuněčného prostoru, což je pozitivní jev spojený s mineralizací kosti. Nejintenzivnější byla tato exprese u vzorku E.

Buňky MG-63 na všech vzorcích se také pozitivně barvily na přítomnost osteokalcinu (OC). Tento specifický kostní protein je produkován osteoblasty a hraje významnou roli při formování kostí. Používá se jako biochemický indikátor kostní přeměny a její kalcifikace. Jeho produkce je podmíněna přítomností vitamínu K. V případě standardu a vzorku C a D byla pozorována nejintenzivnější koncentrace OC v cytoplasmě v okolí buněčných jader a také v jádrech samotných. Nejintenzivnější bylo barvení osteokalcinu u vzorku F. Vysoká koncentrace OC zde byla pozorována v cytoplasmě i buněčných jádrech (Obr. 16 B). Velice omezené množství osteokalcinu se podařilo prokázat u vzorku E, kde došlo k jen omezenému barvení jader, ovšem

nikoli cytoplazmy buněk. I v případě OC byla pozorována jeho exprese do vnějšího prostředí – konkrétně u vzorku D. Pro určení přesné závislosti produkce OC a ALP na morfologii a složení vzorků by bylo nutné dodatečné vyhodnocení jejich koncentrace kolorimetricky. Při vizuálním hodnocení získaných snímků je možné říci pouze, že nejintenzivnější koncentrace obou markerů byla pozorována u vzorku F.



Obr. 15 Snímky buněk MG-63 na standardu a vzorcích C, D, E, F. Pořízené metodou fluorescenční mikroskopie. (Barvivo Alexa Fluor (R) 488. Mikroskop Olympus IX71, kamera DP71, objektiv 20x a 10x (F).)



Obr. 16 Imunofluorescenční barvení (a) alkalické fosfatázy (ALP) a (b) osteokalcinu MG-63 buněk po 8 dnech kultivace na vzorku F. Vyznačena exprese ALP vně buněk. (Konfokální mikroskop Leica DMIRE2, obj. 20x, zoom 4x, měřítko = 25 µm.)

9.19 Závěry kapitoly C

Testování elektrostaticky zvlákněných funkcionalizovaných nanovlákněných materiálů s obsahem kolagenu na růst buněk MG-63 prokázalo vhodnost těchto materiálů pro tkáňové inženýrství kosti. V průběhu testování byl hodnocen vliv morfologie a scaffoldu a obsahu kolagenu na proliferaci, viabilitu a další charakteristiky při buněčném růstu. U testovaných vzorků C, D, E, F byly zaznamenány vyšší počty buněk v kultuře ve srovnání se standardem. U těchto vzorků byla také prokázána tvorba osteokalcinu a alkalické fosfatázy (ALP). Z výsledků – počtů buněk a jejich viability v testovacích dnech – vyplývá, že významnější z parametrů scaffoldů pro proliferaci buněk MG-63 je morfologie nanovlákněné vrstvy. Obsah kolagenu a jeho čistota také hraje významnou roli a jeho nízký obsah se projevuje na poklesu viability buněk po 8 dnech kultivace. V případě shodného obsahu kolagenu byly vyšší hodnoty buněčné populace zaznamenány u vzorků se středním průměrem nanovláken pod 100 nm. Ovšem je nutné zmínit, že byly provedeny pouze primární testy. Pro prokazatelné ověření vlivu obsahu kolagenu a morfologie scaffoldu na proliferaci buněk MG-63 či jinou buněčnou linii bude nezbytné opakování testů s nižším počtem nasazených buněk. Tento postup umožní získání hodnot, které

nebudou ovlivněny možnou nutností pasážování. Dále by bylo vhodné prodloužit dobu kultivace a také doplnit testy například o ověření adheze buněk.

Dále byl ověřen význam správné a dostatečné úpravy materiálu před samotnou kultivací buněk, tj. nutnost zbavení vzorků všech, nebo alespoň většiny, residuí rozpouštědel použitých při tvorbě vrstev.

Jak vyplývá z výsledků této kapitoly, musí být učiněny další kroky – jak v oblasti metodologie testování těchto materiálů, tak i samotné tvorby scaffoldů. V oblasti metodologie je nezbytné stanovit vhodnou dobu vymývání residuí rozpouštědel v závislosti na jejich charakteru a plošné hmotnosti vzorku. Možným řešením této problematiky u plazmaticky roubovaných vzorků s vyšší plošnou hmotností by mohlo být odstranění residuí rozpouštědel ještě před samotnou funkcionalizací kolagenem. Takový postup by umožnil uchování co největšího množství kolagenu ve vzorcích. Vhodnou metodou stanovení nezbytné doby vymývání by mohlo být sledování vodivosti či pH vody po jejím použití. Dále musí být nalezena vhodná metoda vymývání vzorků při současném napětí, která následně umožní ověření vlivu srážením vzniklé mikrostruktury (viz vzorek C) na proliferaci buněk. Vzhledem k nutnosti pronikání buněk do jeho struktury scaffoldu je také nezbytné nalezení optimální metody 3D nanovlákněného scaffoldu. K jeho vytvoření by mohl být využit speciální kolektor při elektrostatickém zvlákňování. Další možností je vytvoření kompozitního scaffoldu s obsahem živých buněk. Ten může být získán krátkou kultivací buněk na povrchu nanovlákněné membrány a jejím následným zpracováním do 3D struktury. Takovou metodu uvádějí například *Hashi and Li (2006)*.

Vzhledem k tomu, že zhruba 50% suché váhy kostní hmoty je tvořeno anorganickými látkami, bylo by příhodným dalším krokem zabudování alespoň některých z nich do struktury scaffoldu. Nejvíce jsou v kostní hmotě zastoupeny ionty kalcia a ionty fosfátové. Ty se zde vyskytují ve formě krystalků hydroxyapatitu o rozměrech 40 x 25 x 3 nm, které jsou většinou orientovány stejně s osou kolagenních fibril. Právě spojení kolagenních fibril a hydroxyapatitu je příčinou pevnosti kostní tkáně. (*Konrádová et al., 2000*) Hydroxyapatit tedy představuje velice zajímavý materiál známý svou schopností osteokondukce a osteogeneze s potenciálem pro tkáňové inženýrství kosti. Ve formě nanokrystalů by mohl být do nanovlákněných scaffoldů zapracován přímo při procesu elektrostatického zvlákňování přidáním do

zvlákňovacího roztoku ve vhodné koncentraci. Tento krok by mohl vést nejen ke zlepšení buněčné proliferace na materiálu, ale také k zlepšení jeho mechanických vlastností.

Závěr

Teoretická část této práce poskytla úvod do oboru tkáňového inženýrství a jeho nároků na nosné struktury (scaffoldy) a materiály. Dále objasnila princip a proměnné elektrostatického zvlákňování jako jedné z metod přípravy nanovláknenných scaffoldů. V teoretické části byl také zpracován přehled běžných biopolymerů, vlastností jejich roztoků a rešerše týkající se využití jejich směsí pro elektrostatické zvlákňování. Rešerše se zaměřila na materiály využívané v experimentální části této práce.

Cílem experimentální části této práce bylo získat nanovláknennou vrstvu z funkcionalizovaných biopolymerů, která by mohla být využita jako scaffold pro tkáňové inženýrství. Takové struktury se v průběhu práce podařilo získat hned dvěma různými metodami funkcionalizace – elektrostatickým zvlákňováním polymerních směsí a polymeračním roubováním na nanovláknenný (mikrovláknenný) substrát.

Nejvýznamnější výsledky elektrostatického zvlákňování směsí biopolymerů jsou tyto.

- (i) Pro rozpouštění kolagenu (K) byly použity různě koncentrované roztoky kyseliny (AA), která je na rozdíl od běžně používaného HFIP netoxická a tedy přijatelná pro tkáňové inženýrství.
- (ii) Směsné roztoky biopolymerů byly úspěšně zvlákňovány tzv. z volné hladiny, což předpokládá možnost jejich zpracování kontinuálně na zařízení Nanospider.
- (iii) Byly získány různé průměry a povrchové struktury nanovláken s různými podíly složek PCL a kolagenu. Za nejzajímavější je možné považovat nanovláknena s průměrem pod 100 nm. Vláknena s nejnižším průměrem 68 ± 21 nm byla získána u hmotnostního podílu PCL/K2 86/14. Nejvyšší dosažený hmotnostní podíl kolagenu 36% při průměru nanovláken 84 ± 35 nm.
- (iv) Přítomnost kolagenu v nanovláknenných vrstvách byla úspěšně prokázána FTIR analýzou.
- (v) Kombinací kolagenu s PCL byla získána ve vodě nerozpustná nanovláknena bez použití často toxických síťovadel. Nanovláknena PCL/K si zachovala vláknennou

strukturu i po třech dnech vymývání ve vodě. (Ověřeno předúpravou pro testy tkáňového růstu.)

- (vi) Testováním na proliferaci a viabilitu buněk MG-63 byla prokázána vhodnost vrstev pro tkáňové inženýrství kosti.

Kromě toho byla také ověřena přinejmenším částečná mísitelnost PCL s kolagenu, která naznačuje interakce mezi oběma polymery.

Nejvýznamnější výsledky funkcionalizace polymeračním roubováním kolagenu jsou následující.

- (i) Bylo úspěšně provedeno plazmaticky iniciované roubování molekul kolagenu a to bez použití tzv. mostů. Celý proces sestával pouze z iniciace vazných míst na povrchu plazmou a roubování smáčením v roztoku kolagenu.
- (ii) Pro plné zaplnění vazných míst byla jako postačující prokázána doba smáčení 30 sekund.
- (iii) Tímto postupem byla získána vysoce porézní mikrovlákná (nanovlákná v případě kapitoly A) s povrchem funkcionalizovaným kovalentně vázaným kolagenem.
- (iv) Přítomnost kolagenu v nanovláknenných vrstvách byla úspěšně prokázána FTIR analýzou i po pěti dnech vymývání.
- (v) Tato metoda umožňuje zpracování i jiných struktur PCL příp. jiných materiálů.
- (vi) Testováním na proliferaci a viabilitu buněk MG-63 nebylo v případě těchto vzorků zcela úspěšné – zřejmě kvůli nedostatečnému odstranění rozpouštědel.

Na základě porovnání intenzit vibrací amidických skupin u FTIR spekter je možné tvrdit, že elektrostatické zvlákňování směsí biopolymerů umožňuje dosažení vyššího podílu kolagenu ve hmotě nanovláken (viz příloha 5). Touto metodou se však, na rozdíl od polymerizačního roubování, nepodařilo získat silně porézní nanovlákná s obsahem kolagenu.

Na základě výsledků experimentů byla podána řada návrhů na další vývoj práce a ověření uvedených výsledků. Ty jsou uvedeny v jednotlivých závěrech kapitol A, B a C. Velice podstatné se jeví ověření vlivu kyseliny octové na denaturaci kolagenu a také nalezení vhodné metody předúpravy vzorků s vyšší plošnou hmotností. Jednou

z hlavních podmínek pro vytvoření funkčního scaffoldu je 3D struktura umožňující prorůstání buněk do jeho struktury. Z tohoto důvodu bych jako možný budoucí směr práce uvedla tvorbu 3D nanovlákněných struktur z PCL/K nanovláken, například s využitím profilovaného kolektoru při zvlákňování.

Použití zdroje

AA, n.d. *Kyselina octová*. [online]

Dostupné na: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Tetrahydrofuran>> [Cit. 10. 4. 2010].

Agarwal, S., Wendorff, J. H. and Greiner, A., 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49 (2008), 5603 – 5621.

Auger, F. A. and Germain, L., 2004. Tissue engineering. In: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, New York: Marcel Dekker, Inc. , pp. 1477 – 1483.

Baji, A., et al. 2010. Electrospinning of polymer nanofibres: Effect on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites science and Technology*, 70 (2010), pp. 703–718.

Bartovská, L. and Šišková, M., 2005. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, 5. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. (ISBN: 80-7080-579-X)

Běhálek , L., 2007. *Hodnocení nadmolekulární struktury plastů*. [online] Dostupné na: <<http://www.ksp.tul.cz/cz/.kpt/obsah/vyuka/Intech/Morfologie.pdf>> [Cit. 5. 4. 2012].

Beckham, M. J., Shields, K. J. and Diegelman, R. F., 2004. In: G. E. Wuek and G. L. Bowlin eds., 2004. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, New York: Marcel Dekker, Inc. , pp. 324 – 334.

Benoit, J. et al., 1988. Comparative effects of four surfactants on growth, contraction and adhesion of culture human fibroblasts. *Cell Biology and Toxicology*, 4 (1), pp. 111 – 122.

Bhardwaj, N. and Kundu, S. C., 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28 (2010), pp. 325 – 347.

Bílek, F., 2006. *Příprava bioaktivních povrchů pomocí fyzikálně-chemických metod a jejich aplikace*. BP, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

Boland, E.D.et al., 2004b. Electrospinning collagen and elastin: *Preliminary vascular tissue engineering*. *Frontiers in Biosciences*, 9 (2004), pp. 1422 – 1432.

Boland, E. D., Espy, P. G. and Bowlin, G. L., 2004a. Tissue engineering scaffolds. In: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, New York: Marcel Dekker, Inc. , pp. 1630 – 1638.

- Buttafoco, L. et al., 2006. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 27 (2006), pp. 724 – 734.
- Casper, Ch. L. et al. 2004. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning process. *Macromolecules*, 37(2) 573 – 578.
- Cai, Z. X. et al., 2010. Fabrication of Chitosan/Silk Fibroin Composite. Nanofibers of Wound – dressing Applications. *International journal of Molecular Sciences*, 11(9), pp. 3529 – 3589.
- Cao, H. et al., 2009. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61 (2009), pp. 1055 – 1064.
- Chen, Z., Xiumeio, M. and Qiog, F., 2007. Electrospinning of collagen – chitosan complex. *Materials Letters*, 61 (2007), pp. 3490 – 3494.
- Cheng, Z. and Teoh, S.-H., 2004. Surface modification of ultra thin poly (ϵ -caprolactone) films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials*, 25 (2004), pp. 1991 – 2001.
- Choi, J. S. et al., 2008. The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofibers meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials*, 29(2008), pp. 2899 – 2906.
- Ciardelli, G. et al., 2005. Blends of poly(ϵ -caprolactone) and polysaccharides in Tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 6 (4), pp. 1961 – 1976.
- Dakhara, S. L. and Anajwala, C. C., 2010. Polyelectrolyte complex: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmaci*, p 1(2), pp. 121 – 127.
- Deanin, R.D., 1977. Polyblends. In: H.F. Mark and N.M. Bikales, eds. *Encyclopedia of polymer science and technology*. Supplement Vol.2. New York: John Wiley & Sons. pp. 458 – 484.
- Dhandayuthapani, B., Krishnanl, U. M and Sethuraman, S., 2010. Fabrication and characterization of chitosan – gelatin blend nanofibres for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research part B – Applied Biomaterials*, 94B(1), pp. 264 – 272.
- DMSO, n.d. *Dimethyl sulfoxide*. [online]
Dostupný na: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Tetrahydrofuran>> [Cit. 10. 4. 2010].
- Dong, B. et al., 2009. Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds from benign solvents. *Macromolecular rapid communications*, 30 (2009), pp. 539 – 542.
- Duan, B. et al., 2004. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). *Journal of Biomaterials Science – Polymer edition*, 15 (6), pp. 797 – 811.
- DSC, 2000. *Differential scanning calorimetry*. Colorado State University. [online]
Dostupný na: <<http://www1.ch.colostate.edu/Files/CIFDSC/dsc2000.pdf>> [Cit. 10. 4. 2012].

- Eberli, D. 2010. Preface. In: D. Eberli. ed. 2010. Tissue Engineering. Vukovar: In – Teh. pp. V – VI.
- Eisenbarth, E., 2007. Biomaterials for Tissue Engineering. *Advanced Engineering Materials*, 9(12), pp. 1051 – 1060.
- Fišner, B. et al., 1968. *Základy obecné a fyzikální chemie*, 1. Vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- Foltran et al., 2008. Novel biologically inspired collagen nanofibers reconstructed by electrospinning method. *Macromolecular Symposia*, 269 (2008), pp. 111 – 118.
- Formhals, A., Gastel, R. S. 1934. Process and apparatus for preparing artificial threads. U. S. Pat. 1975504.
- Gopal, R. et al., 2007. Surface modification and application of functionalized polymer nanofibers. *Topics in Applied Physics*, 109 (2007), pp. 72 – 91.
- Grabaczyk, J. and Kotela, I., 2009. Plasma modification of medical implants by carbon coatings deposition. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 37(2), pp. 277 – 281.
- Hang et al., 2010. Hang, A. T. et al. 2010. Non – woven mats of poly (vinylalkohol) chitosan blends containing silver nanoparticles: Fabrication and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 82(2010), pp. 472 – 479.
- Hashi, C. and Li, S., 2006. Tissue engineered nanofibrous vascular grafts. *Molecular & Cellular Biomechanics*, 3 (4), p. 135.
- Hassan, A. B., 2008. *Human bone tissue engineering using coral and differentiated osteoblasts from derived – mesenchymal stem cells*. Ph.D. University Sains Malaysia.
- Horák, Z., 1988. *Kompatibilizace polymerů*. In: J. Kolarík ed. *Nové trendy v polymerních materiálech (sborník přednášek)*. Praha: Ústav makromolekulární chemie AV ČR, pp. 18 – 26.
- Hrdová, L. 2008. *Želatina – vlastnosti, metody charakterizace a její použití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu*. BP, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- Huang, L. et al., 2001. Engineered collagen – PEO nanofibers and fabrics. *Journal of biomaterials science – Polymer edition*, 12 (9), pp. 979 – 993.
- Huang, C. et al, 2011. *Electrospun collagen – chitosan – TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82 (2011), pp. 307 – 304.
- Jia, Y.-T. et al., 2007. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend nanofiberst produced by electrospinning method. *Carbohydrate Polymers*, 67 (2007), pp. 403 – 409.
- K9, 2000. *Digitální tenziometr K9: Manuál V02*. Krüss GmbH, Hamburg.

- Káš, J. et al., 2006. *Laboratorní techniky chemie*, 1. Vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT
- Katz, J. L., Ambrose, C. G. and Spencer, P., Orthopdic Biomaterials. In: G. E. Wuek and G. L. Bowlin eds., 2004. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 1160 – 1169.
- Kim, T.G. et al., 2008. Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta Biomaterialia*, 4 (2008), pp. 1611 - 1619
- Knott, L., Tarlton, J. F. and Bailey, A. J., 1997. Chemistry of collagen cross-linking: biochemical changes in collagen during the partial mineralization of turkey leg tendon. *Biochemical Journal*, 322 (1997), pp. 535 542.
- Konrádová, V. et al., 2000. *Funkční histologie*, 2. vyd. Praha: Univerzita Karlova 2.LF (ISBN 80-86022-80-3)
- Kraml, J., 1999. *Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie*, 2. Vyd. Praha: Karolinum.
- Krebsová, M., 1979. *Nauka o polymerech*. Liberec: Vysoká škola strojní a textilní v Liberci.
- Kriegel, C. et al., 2009. Electrospinning of chitosan – poly(ethylene oxide) blend nanofibres in presence of micellar surfactant solutions. *Polymer*, 50 (2009), pp. 189 – 200.
- Kubinová, Š. and Syková, E., 2010. Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minimally Invasive Therapy*, 19 (2010), pp. 144 – 156.
- Kultivace, 2009. *Kultivace buněk in vitro*. [online] Dostupné na: <http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf> [Cit. 7.2. 2012]
- Landgraf et al. (2009) Landgraf, R. et al., 2009. Functionalization of Polymer Sensor surfaces by Oxygen Plasma Treatment. *Procedia Chemistry*, 1(2009), pp. 1015 – 1018.
- Lee, C. H. Singla, A. and Lee, Y., 2001. Review: Biomedical application of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221 (2001), pp. 1 – 22.
- Lee, H.-U. et al., 2008. Role of reactive gas in atmospheric plasma for cell attachment and proliferation on biocompatible poly-ε-caprolactone film. *Applied Surface Science*. 254 (2008), 5700 – 5705.
- Lee, H. W. et al. 2009a. Poly(vinyl alcohol)/chitosan oligosaccharide blend submicrometer fibers prepared from aqueous solution by electrospinning method. *Journal of Applied Polymer Science*, 111(1), pp. 132 – 140.
- Lee, K. Y. et al. 2009b. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61 (2009), pp. 1020 – 1032.

- Lee, S.H., Yeon, J. W. and Suh M.H., 2002. Continuous nanofibers manufactured by electrospinning technique. *Macromolecular Research*, 10 (5), pp. 282 – 295.
- Lev, J., Kalhotka, L. and Černý, M., 2010. Nanotextilní membrány pro zachycení bakterií *Escherichia coli*. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LVIII (5), pp. 239 – 246
- Liang, D., Hsiao, B. S. and Chu, B. 2007. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007), pp. 1392 – 1412.
- Liao, S., Chan, C. K. and Ramakrishna, S., 2008. Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, C 28 (2008), pp. 1189 – 1202.
- Liu, H.-C. et al., 2004. Preparation of PLLA membranes with different morphologies for culture of MG-63 cells. *Biomaterials*, 25 (2004), pp. 4047 – 4056.
- Liu, T. et al., 2010. Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: Synthesis, characterization and neural stem cell interactions. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 95A (1), pp. 276 – 282.
- Lubasová, D., 2007. *Příprava nanovláknenných vrstev s vysokým obsahem kolagenu*. DP (MSc). Technická univerzita v Liberci
- Lubasová, D. and Martinová, L. 2009. Mechanismus tvorby porézních nanovláken z polykaprolaktonu připravených elektrostatickým zvlákněním. In: *NANOCON[®] 2009; 1st International conference focused on nanomaterials, on their research, application and potential impact on the environment and human health*. Rožnov pod Radhoštěm, Czech republic, 20 – 22 October 2009. Ostrava: Tanger spol. s r. o.
- Machado, A. A., Martins, V. C. A. and Plenis, A. M. G., 2002. Thermal and rheological behavior of collagen/chitosan blends. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67 (2002), pp. 491 – 498.
- Martinová, L. and Lubasová, D., 2011. Reasons for using polymer blends in the electrospinning process. In: *SIRIM: International conference on nanotechnology – research and commercialisation (ICONTEC 2011)*. Sabah, Malaysia, 6 – 9 June 2011.
- Matthews, J. A. et al., 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3 (2), pp. 232 – 238.
- McPherson, J.M., Sawamura, S.J. and Conti, A., 1986. Preparation of [³H] collagen for studies of biologic fate of xenogenic collagen implants in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*, 86 (6), pp. 673 – 677.
- Megelski, S. et al., 2002. Micro and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, 35 (22), pp. 8456 – 8466.
- Mickova, A. et al., 2012. Core/Shell nanofibres with embedded liposomes as a drug delivery systems. *Biomacromolecules*, 13(4), pp. 952 – 962.

- Mikeš, V. 1997. *Základní pojmy z biochemie*. Brno: Masarykova univerzita Brno.
- Mleziwa, A. J. and Kálal, J., 1986. *Základy makromolekulární chemie*. 1. Vyd. Praha: SNTL.
- Mohamed, A. et al. 2008. Thermal Properties of PCL/gluten Bioblends Characterized by TGA, DSC, SEM and Infrared – PAS. *Journal of Applied Polymer Science*, 110(2008), pp. 3256-3266.
- Nanospider, n. d. *Nanospider, n. d. Nanospider™ Technology* [Online]
Dostupné na:
<http://elmarco.com/technology/nanospider%3Csup%3Etm%3Csup%3E-technology/> [Cit. 10.12.2011]
- Oh, J. K. et al., 2009. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, 34 (2009), pp. 1261 – 1282.
- Ohkawa, K., et. al., 2004. Electrospun nonwoven fabrics of poly (ϵ – caprolactone) and their biodegradation by pure cultures of soil filamentous fungi. *Macromolar Symposia*, 216(1), pp. 301 – 306.
- Östman, P. – O. and Kärner, A., 2009. Pokročilé technologie pro urychlenou rehabilitaci pacienta. *Implantologie*, 18 (2009). pp. 53 – 64. [Online] Dostupné na : <http://biomet3i.cz/data/Osmann.pdf> [Cit. 8. 9. 2011].
- Pachence, J. M. and Kohn, J., 2000. *Biodegradable polymers*. In: Lauza, P. R. et al. eds., 2000. *Principles of Tissue Engineering*. 2nd ed. London: Academic Press, Ch. 22.
- Pautke, Ch. et al., 2004. Charakterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer research*, 24 (6), pp. 3743 – 3748.
- PCL, n.d. *PCL synthesis*. [online]
Dostupný na: < [http:// en.wikipedia.org/wiki/File:PCL_synthesis.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:PCL_synthesis.png) > [Cit. 4. 5. 2012].
- pH 700, n.d. *Eutech pH 700: Product features* [online]
Dostupný na: <http://www.eutechinst.com/pdt_para_ph_ph700.html> [Cit. 2. 5. 2012].
- Picciani, P. H. S. et al, 2010. Structural, Electrical, Mechanical and thermal properties of electrospun poly(lactic acid)/ polyaniline blend fibers. *Macromolecular materials and engineering*, 295 (7), pp. 618 – 627.
- Pokorný, P., 2011. *Analýza procesu elektrostatického zvlákňování a možnosti jeho řízení:autoeferát disertační práce*. DP (PhD). Technická univerzita v Liberci
- Pouchlý, J., 2001. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. VŠCHT. Praha, 01-293-32/01
- Proteomika, 2006. [online]
Dostupné na: http://www.uhkt.cz/files/proteomika/Proteomika_2D_PAGE.pdf

[Cit. 5.3. 2012]

- Ramakrishna et al., 2005. Ramakrishna, S. et al., 2005. An introduction to electropinning and nanofibers. World Scientific Publishing, Co., Singapore.
- Rho, K. S. et al. 2006. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratocytes and early – stage wound healing. *Biomaterials*, 27 (8), pp. 1452 – 1461.
- Richard – Blum, S. and Ruggiero, F., 2005. The collagen superfamily: from extra cellular matrix to the cell membrane. *Pathologie biologique*, 53 (2005), pp. 430 – 442.
- Rysová, M., 2010. Možnosti výroby scaffoldů pro tkáňové inženýrství s obsahem kolagenu. In: : *Studentská vědecká a odborná činnost 2010 (SVOČ 2010)*, Liberec, Česká republika, 20. Květen 2010. Liberec: Technická univerzita v Liberci. (ISBN 978-80-7372-601-0)
- Rysová, M., 2011. Elektrostatické zvláknování polymerních směsí pro účely tkáňového inženýrství. In: *Studentská vědecká a odborná činnost 2011 (SVOČ 2011)*, Liberec, Česká republika, 25. Květen 2011. Liberec: Technická univerzita v Liberci. (ISBN 978-80-7372-174-9)
- Rysová, M. et al., 2011a. Collagen loaded nanofibrous sheets as a scaffold for bone tissue engineering. In: *The 24th European conference on Biomaterials, Dublin, Ireland, 4 – 8 September 2011*.
- Rysová, M. et al., 2011b. Plasma induced collagen functionalization of nanofibres. In: *The 8th International conference on Nanoscience and Nanotechnologies (NN11)*, Thessaloniki, Greece, 12 – 15 July 2011.
- Řasa, J., Kerečaninová, Z., 2008. *Nekonvenční metody obrábění 10. díl*. [online]
Dostupné na:
<<http://www.mmspektrum.com/clanek/nekonvencni-metody-obrabeni-10-dil.html>> [Cit. 8.2. 2012]
- Schnell, E. et al., 2007. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofiber of poly-ε-caprolactone and a collagen/poly-ε-caprolactone blend. *Biomaterials*, 28(2007), pp 3012 - 3025.
- Schumann, D. et al., 2007. *Biomaterials/Scaffolds: Design of Bioactive, Multiphasic PCL/Collagen Type I and Type II-PCL-TCP/Collagen Composite Scaffolds for Functional Tissue Engineering of Osteochondral Repair Tissue by Using Electrospinning and FDM Techniques*. In: Hauser, H. and Fussenegger, M. eds., 2007. *Methods in Molecular Medicine*, 2nd ed.: Tissue Engineering. Totowa: Humana Press Inc., Ch. 6.

- Sell, S. A. et al., 2009. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Advanced drug delivery systems*, 61 (2009), pp. 1007 – 1019.
- Seifu, D.G. et al., 2011. *Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated – zeolite oxygen vectors*. *Acta Biomaterialia*, 7 (10), pp. 3670 – 3678.
- Sill, T. S. and von Recum, H. A., 2008. Electrospinning : Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29 (2008), pp. 1989 – 2006.
- Skrzyński, S., Sionowska, A. and Marciniak, A., 2009. DSC study of Collagen Disase. *Journal of Biophysics*, 2009.
- Son, W. K. et al., 2005. Effect of pH on electrospinning of poly(vinyl alcohol). *Materials Letters*, 59 (12), pp. 1571 - 1575
- Stevens, M. M. and George, J. H., 2005. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 310 (5751), pp. 1135 – 1138.
- Su et al., 2008. *Surface coatings*. In: G. E. Wuek and G. L. Bowlin eds., 2004. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2nd ed., New York: Marcel Dekker, Inc. , Ch. 241.
- Subia, B., Kundu, J. and Kundu, S. C., 2010. *Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications*. In: D. Eberli. ed. 2010. *Tissue Engineering*. Vukovar: In – Teh. Ch.7.
- Subbiah, T. et al., 2005. Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96 (2005), pp. 557 – 569.
- THF, n.d. *Tetrahydrofuran*. [online]
Dostupný na: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Tetrahydrofuran>> [Cit. 10. 4. 2010].
- Teng, S. H. et. al., 2008. Collagen(hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning. *Materials Letters*, 62 (2008), 3055 – 3058.
- Thomson, R. C. et al., 2000. *Polymer Scaffold Processing*. In: Lauza, P. R. et al. eds., 2000. *Principles of Tissue Engineering*. 2nd ed. London: Academic Press, Ch. 21.
- Tillman, B. W. et al. 2009. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone – collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials*, 30(4), pp. 583-588.
- Van den Velde, K. and Kiekens, P., 2002. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer testing* 21 (2002), pp. 433 – 442.
- Vaníček, J., (n.d.). *Metody termické analýzy*. [online]
Dostupný na: <<http://www.ft.vslib.cz/depart/htm/files/20060106/prednaska4.pdf>> [Cit. 2. 4. 2012]
- Vodrážka, Z., 1969. *Malé makromolekulární monografie 4: Biopolymery*. Praha: Česko-Slovenská Akademie Věd.

- Voett, D. and Voet, J. G., 1995. Biochemistry, 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Vollmert, B., 1970. *Základy makromolekulární chemie*, 1. Vyd. Praha: Academia Press.
- Vondran, J. L., Sun, W. and Schauer, C. L., 2008. Crosslinked, electrospun chitosan - poly(ethylene oxide) nanofiber mats. *Journal of Applied Polymer Science*, 109 (2008), pp. 968 – 975.
- Wang, X. et al., 2005. Formation of water – resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing – assisted electorspinning and non – toxic post treatment. *Polymer*, 46 (2005); 4853 – 4867.
- Woodruff, M. A. and Hutmacher, D. W., 2010. The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* ,35 (2010), pp. 1217–1256
- Xu, C. Y. et al., 2004. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*, 25 (2004), pp. 877 – 886.
- Xu, F. J., Wang, Z.H. and Yang, W.T., 2010. Surface functionalization of polycaprolactone films via surface-initiated atom transfer radical polymerization of covalently coupling cell-adhesive biomolecules. *Biomaterials*, 31 (2010), pp. 3139 – 3147.
- Yang, X. and Wang, H. 2010. Electrospun Functional Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. In: D. Eberli, ed. 2010. Tissue Engine. nano
- Yeo, H. G. and Kim, G. H., 2011. Preparatiom and characterization of 3D Composite Scaffolds Based on Rapid – Prototyped PCL/ β -TCP Struts and Electrospun PCL Coated with collagen and HA for Bone regeneration, *Chem. Mater.* (Abstrakt)
- Yoo, H. S., Kim, T. G. and Park, T. G., 2009. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61 (2009), pp. 1033 – 1042.
- Zhang, et al., 2009. Studies on electrospun nylon-6/chitosan complex nanofiber interactions. *Electrochimica Acta*, 54 (2009), pp. 5739 – 5745.
- Zhang et al., 2008. Preparation and characterization of silk fibroin blended biodegradable polymer nanofibers. In: *International Symposium on fiber based scaffolds for tissue engineering*. 8th – 9th December 2008. Ahankai: China.
- Zhong, S. et al., 2006. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *Journal of Biomedicel Materials Reserch*, Part A (2006), pp. 456 – 463.
- Zhang,Y. Z. et al., 2007. Biomimetic and bioactive nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers. *International Journal of Nanomedicine*, 2 (4), pp. 623 – 638.

- Zhong, P. S. et al, 2007. Development of a novel collagen – GAG nanofibrous scaffold via electrospinning. *Materials Science and Engineering*, C27 (2007), pp. 262 – 266.
- Zoccola, M. et al., 2007. Electrospinning of polyamide 6/modified-keratin blends. *E – Polymers*. [e-journal] 105, Abstract only. Dostupný přes: <<http://www.e-polymers.org>> [Cit. 10. 11. 2011]

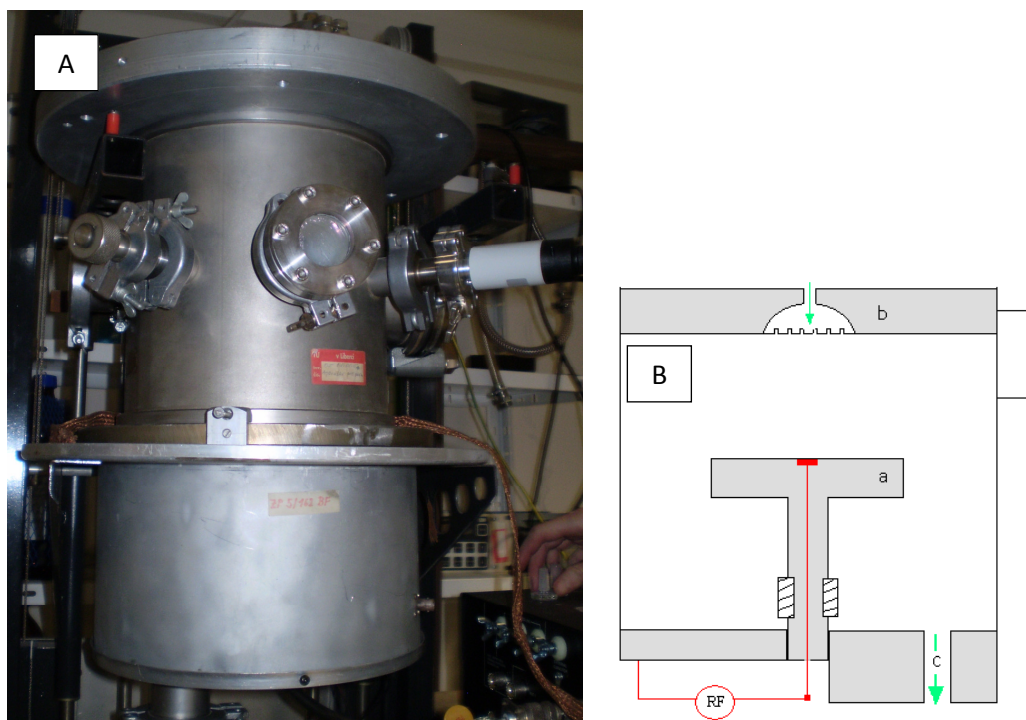
PŘÍLOHOVÁ ČÁST

Seznam příloh:

- P1: Vakuová aparatura pro vysokofrekvenční (RF) plazma
- P2: Výsledky měření povrchového napětí
- P3: Funkcionalizované nanovláknenné vrstvy PCL/K
- P4: Výsledky DSC analýzy
- P5: Výsledky FTIR analýzy
- P6: Nanomateriály použité pro testy tkáňového růstu
- P7: Mikrostruktura vzorku C
- P8: Postupy testů tkáňového růstu
- P9: Výsledky testů tkáňového růstu
- P10: Imunofluorescence markerů ALP a OC

Příloha 1: **Vakuová aparatura pro vysokofrekvenční (RF) plazma**

Vakuová aparatura pro vysokofrekvenční (RF) plasma je zobrazena na obr. P1.1. Skládá se z hlavní komory vybavené elektrodou pro vývoj plazmatu, přívodem atmosféry a jejím odtahem. Nerezová elektroda je připojena ke zdroji napětí a slouží k umístění upravovaného vzorku, zbytek komory je uzemněn. To umožňuje intenzivní úpravu vzorku, neboť nejvyšší koncentrace excitovaných částic je právě na povrchu a v okolí této elektrody. Zařízení využívá generátor napětí AGG-3 (až 13,56 MHz) připojený přes impedanční jednotku Antenna Tunner TEN-TEC 238B. Plyn atmosféry je při úpravě přiváděn do komory přes sprchový vstup a průtok plynu je řízen pomocí průtokoměru Mass Flow Metter. Vysoké vakuum je zajištěno kombinací olejové rotační a Rootsovy pumpy (vývěvy). Při výstupu z komory prochází plyn přes dusíkovou chladicí jímku, která umožňuje zachycení nečistot. Tlak v komoře je měřen vakuometrem Pirani TPR 010.

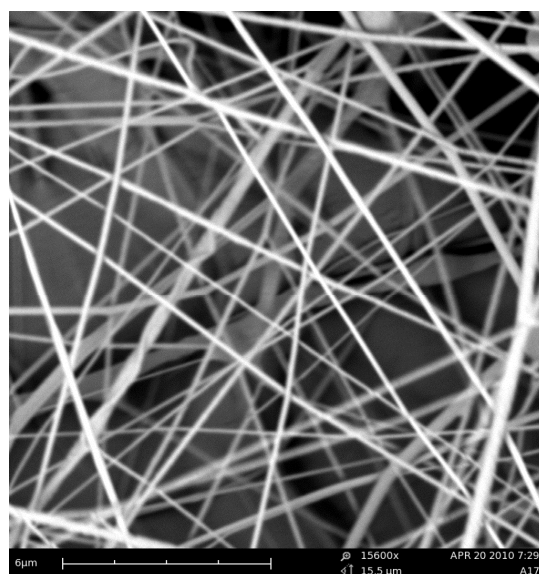
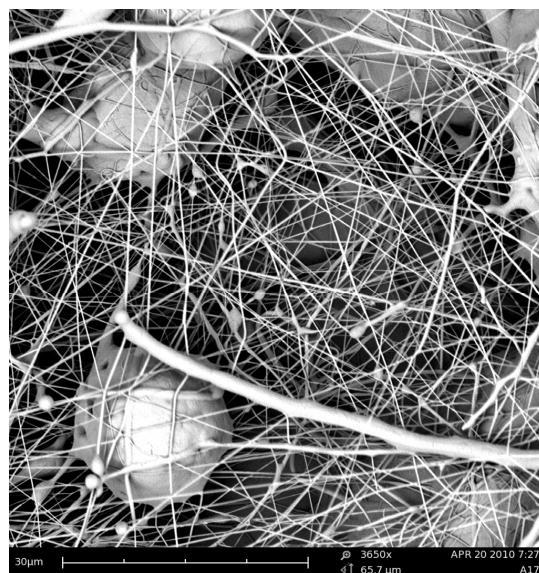
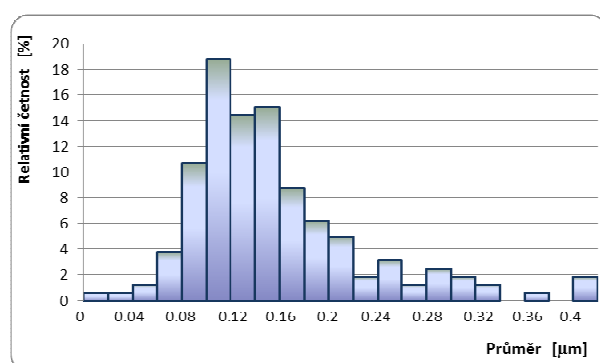


Obr. P1.1 Vakuová aparatura pro vysokofrekvenční (RF) plazma: (A) vnější pohled a (B) vnitřní uspořádání; a - nerezová elektroda, b - sprchový vstup plynu, c – odtah plynu k vývěvám.

Příloha 2: Povrchové napětí roztoků

Tab. P2-1 Výsledky měření povrchového napětí.

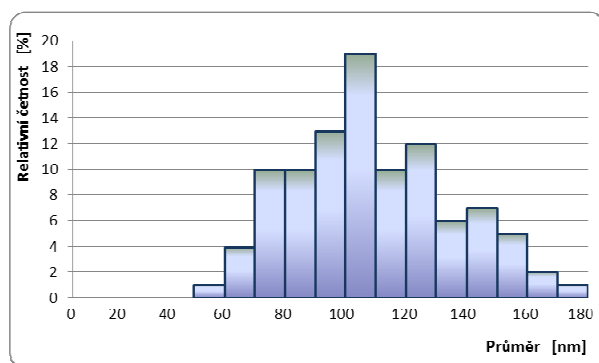
18% PCL HF/DMSO)	Povrchové napětí [mN/m]						
	18% PCL (THF/AA)	3% K2 (70AA)	3% K2 (86AA)	5% K2 (86AA)	3% K2 (99AA)	PCL(THF/DMSO)/3K(86AA)	PCL(THF/AA)/3K(86AA)
						(1/1)	(1/1)
32,6	27,8	31,3	31,5	31,2	27,6	32,3	31,5
32,2	29	30,7	31,3	30,9	27,5	32,4	31,7
33,1	27,8	31,5	31,1	31	27,5	32,5	31,4
32,4	28,1	30,9	31,2	31	27,6	32,4	31,7
32,5	28,3	31,8	30,9	31,1	27,5	32,6	31,7
32,56	28,2	31,24	31,2	31,04	27,54	32,44	31,6
0,336	0,495	0,445	0,224	0,114	0,055	0,114	0,141

Příloha 3: Nanovláknenné vrstvy PCL/K

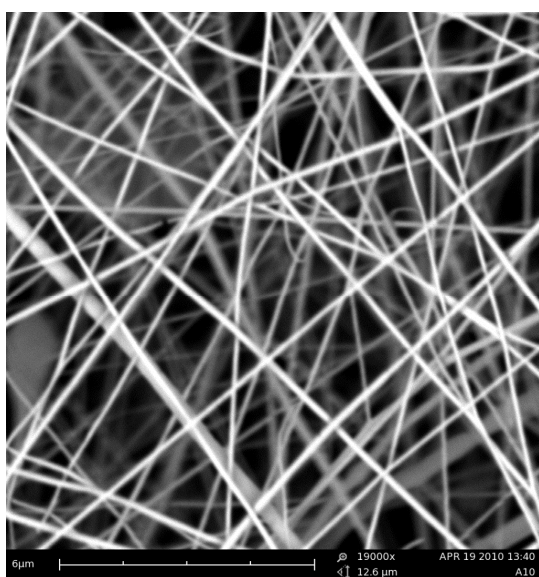
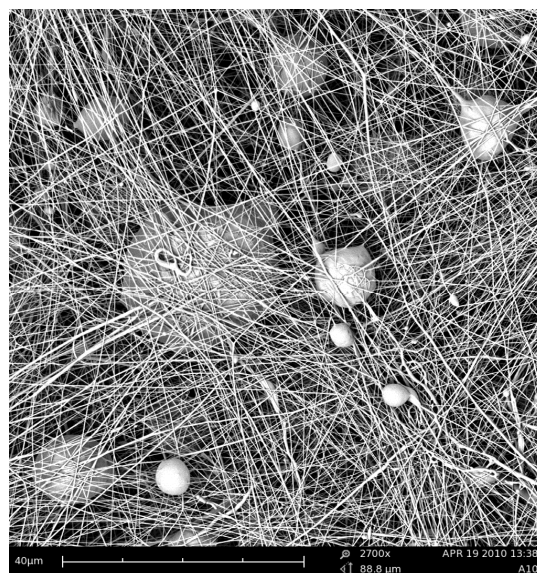
	Hodnota [nm]
Průměr	156.9
S.D.	72.4
S.E.M.	5.7
Min	17
Max	414

S.D. – směrodatná odchylka

S.E.M. – standardní chyby průměru (Standard Error of Mean)

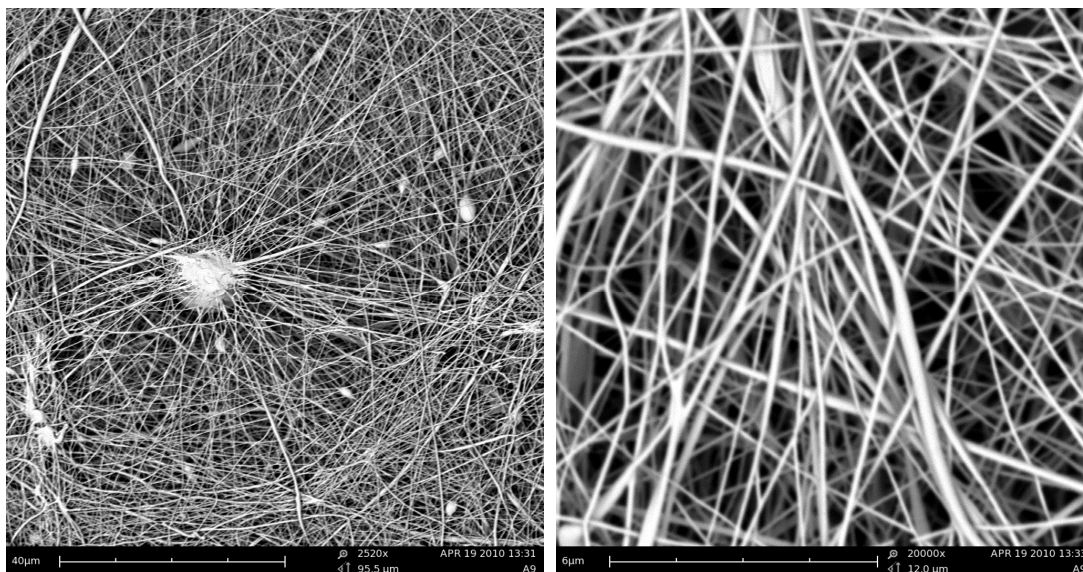


Obr. 1 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL. Zvlákněná z roztoku 18% (THF/AA). Procesní parametry: 13 cm, 36 kV.



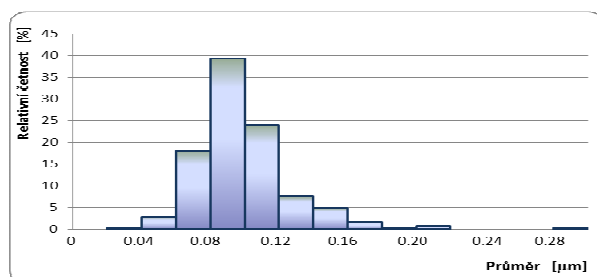
	Hodnota [nm]
Průměr	108.3
S.D.	26.4
S.E.M.	2.6
Min	51.9
Max	172.5

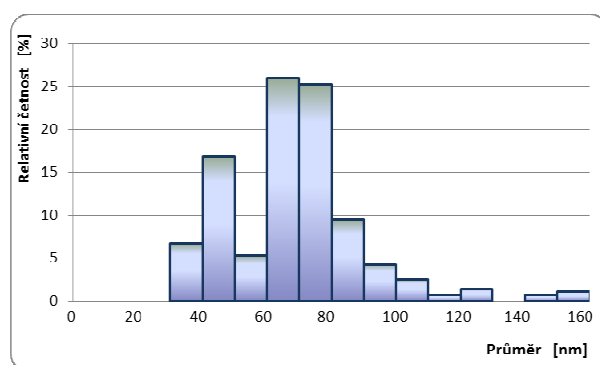
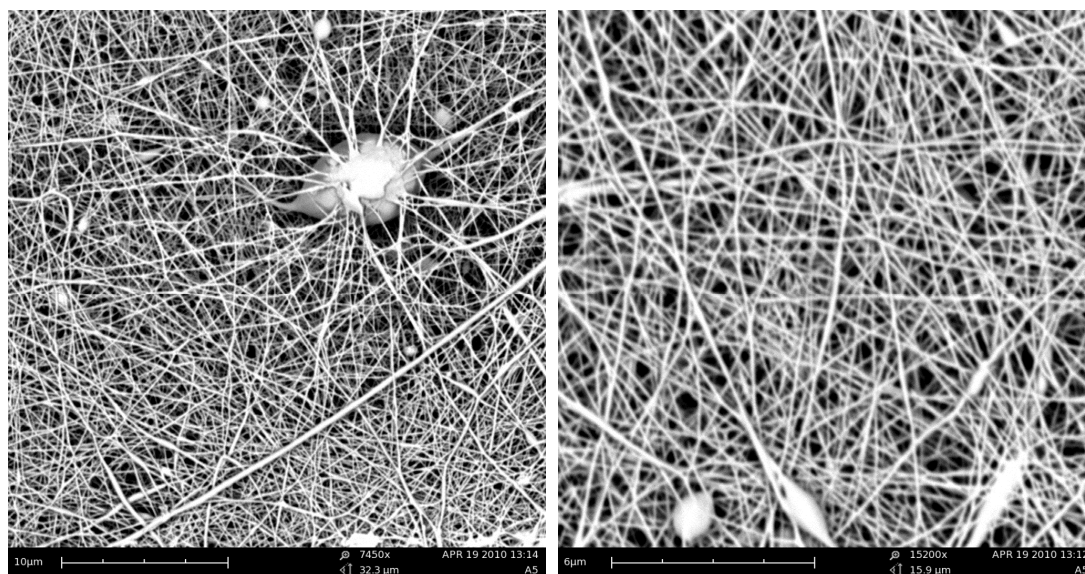
Obr. 2 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 98/2 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (86AA) v poměru 5:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 36 kV.



	Hodnota [nm]
Průměr	99.0
S.D.	29.4
S.E.M.	1.86
Min	30.2
Max	299.6

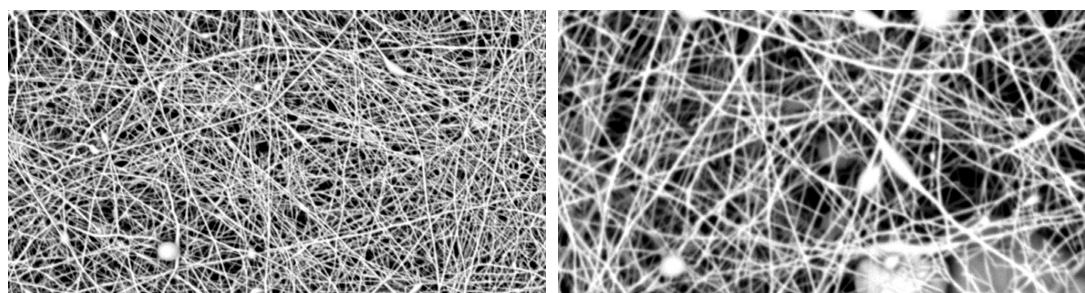
Obr. 3 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 92/8 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (86AA) v poměru 2:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 36 kV.

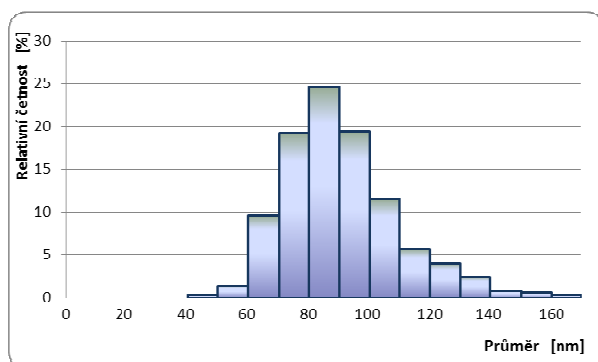




	Hodnota [nm]
Průměr	68.4
S.D.	21.1
S.E.M.	1.24
Min	34
Max	158

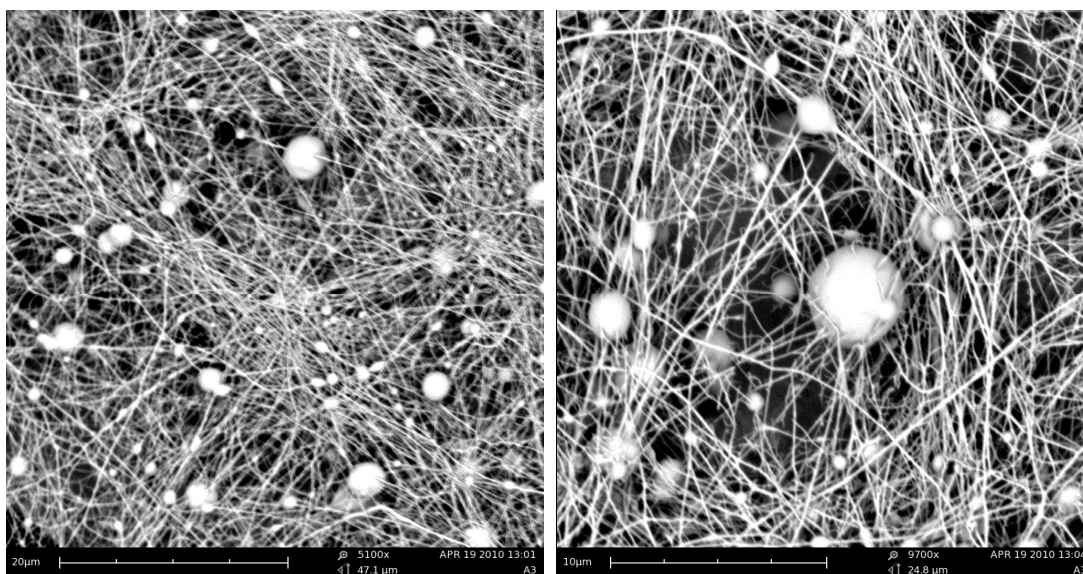
Obr. 4 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 36 kV.





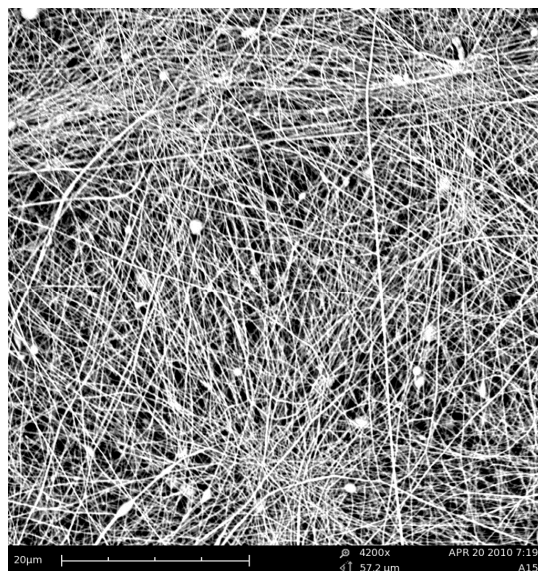
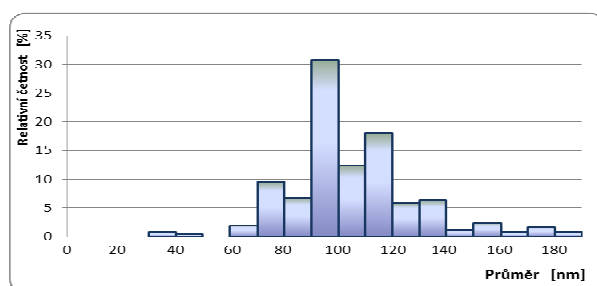
	Hodnota [nm]
Průměr	90.4
S.D.	19.2
S.E.M.	0.86
Min	42.7
Max	166.4

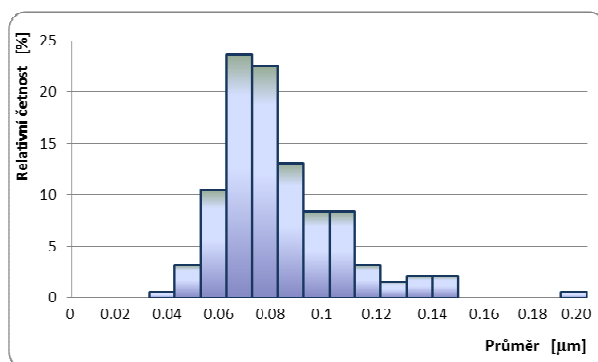
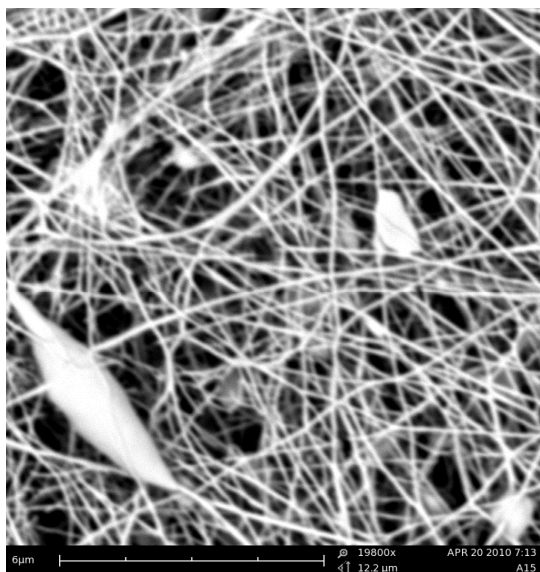
Obr.5 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 45 kV.



	Hodnota [nm]
Průměr	104.4
S.D.	23.5
S.E.M.	1.5
Min	37
Max	186.3

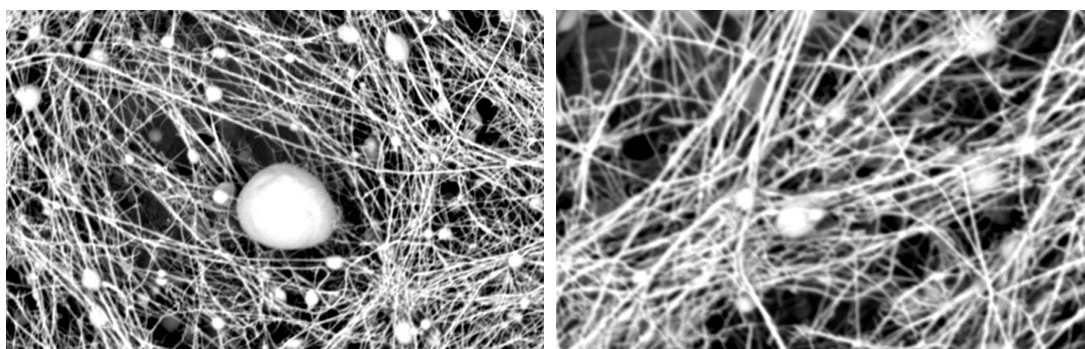
Obr. 6 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 54 kV.

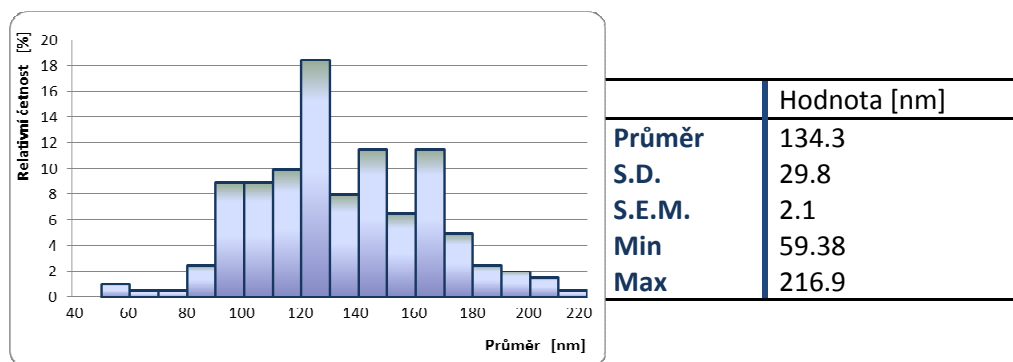




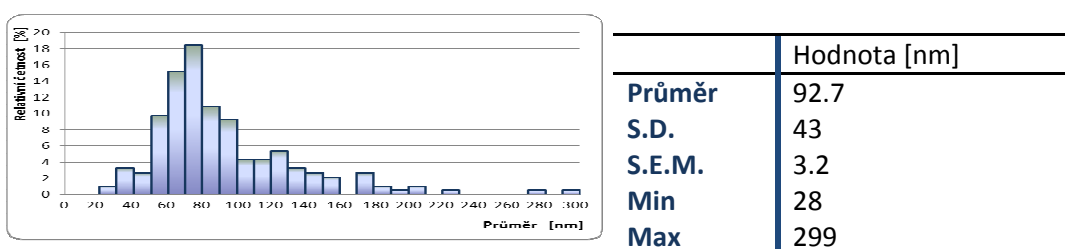
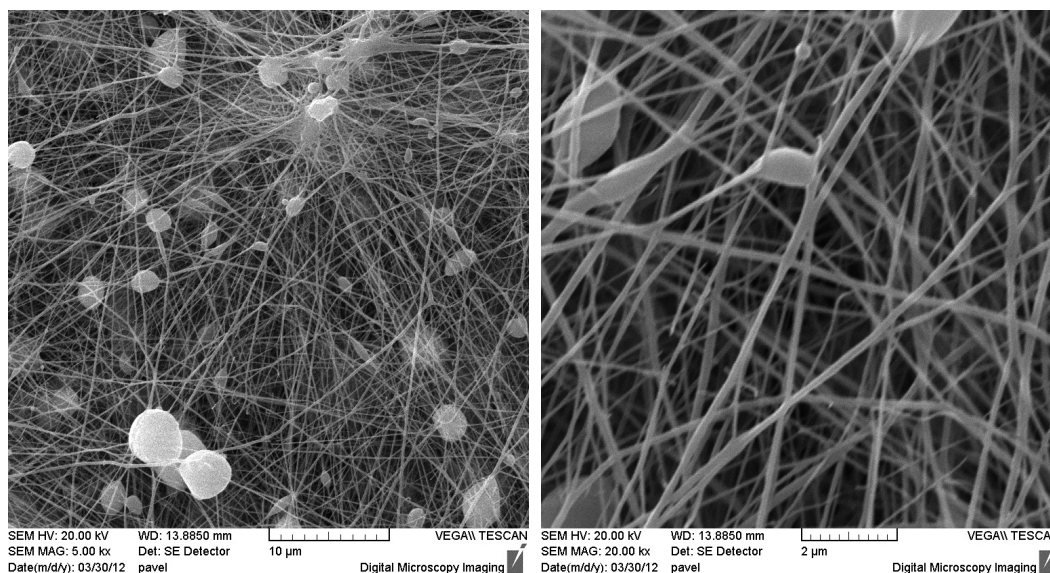
	Hodnota [nm]
Průměr	81.9
S.D.	22.6
S.E.M.	1.64
Min	40.0
Max	195.0

Obr. 7 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (99AA) v poměru 1:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 45 kV.

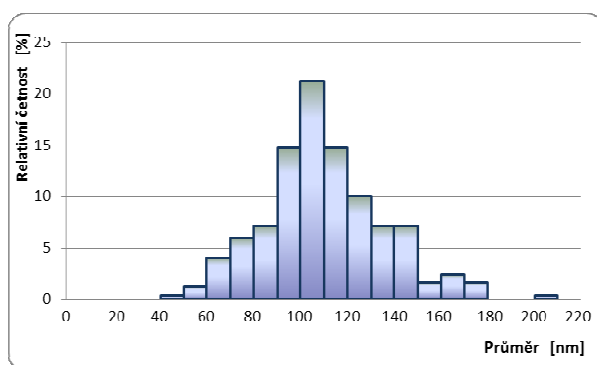
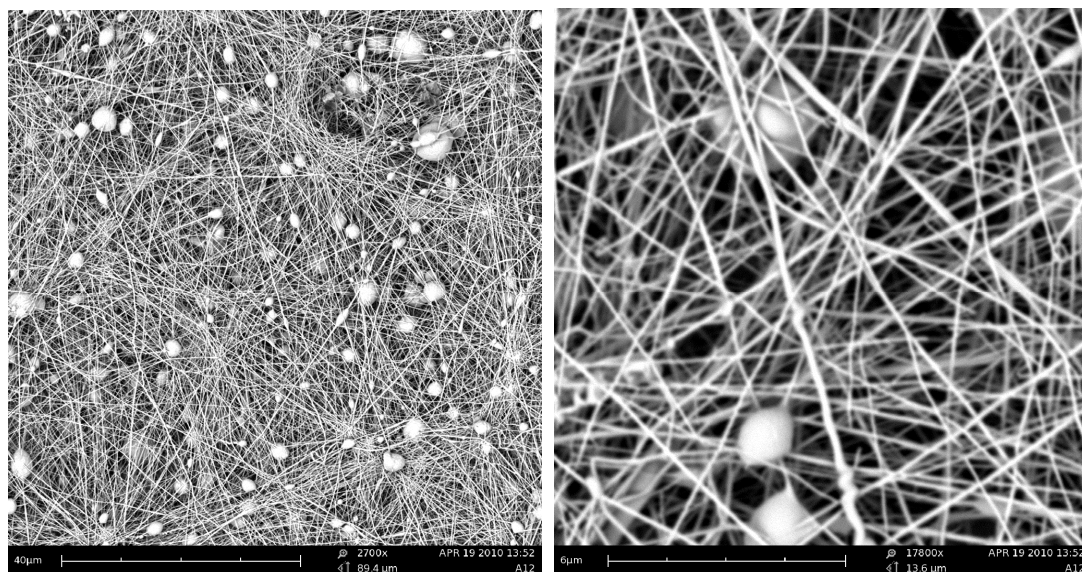




Obr. 8 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (99AA) v poměru 1:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 54 kV.

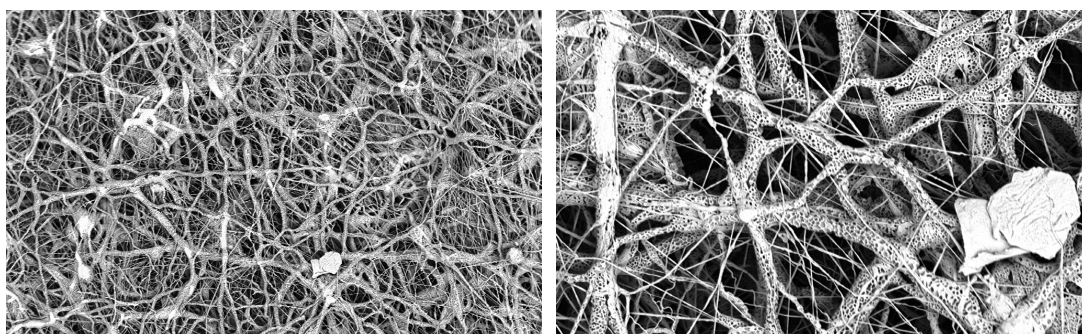


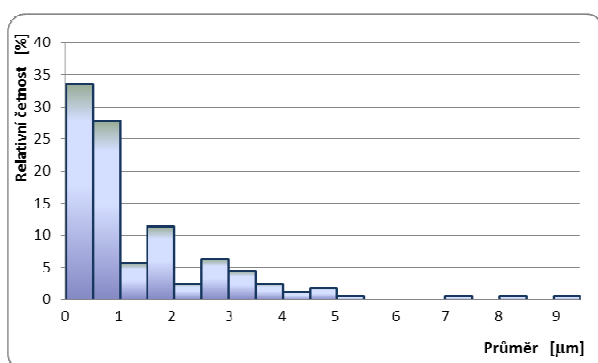
Obr. 9 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 92/8 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (99AA) v poměru 2:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 36 kV.



	Hodnota [nm]
Průměr	110.6
S.D.	25.3
S.E.M.	1.6
Min	43.8
Max	299

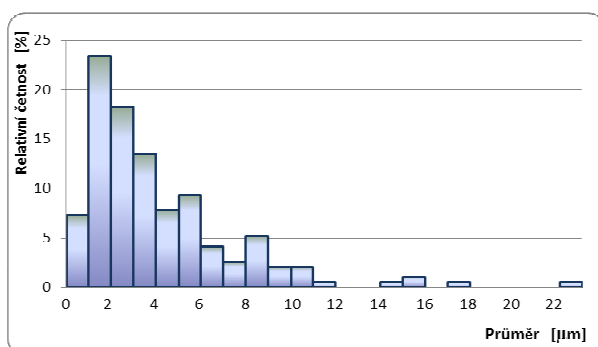
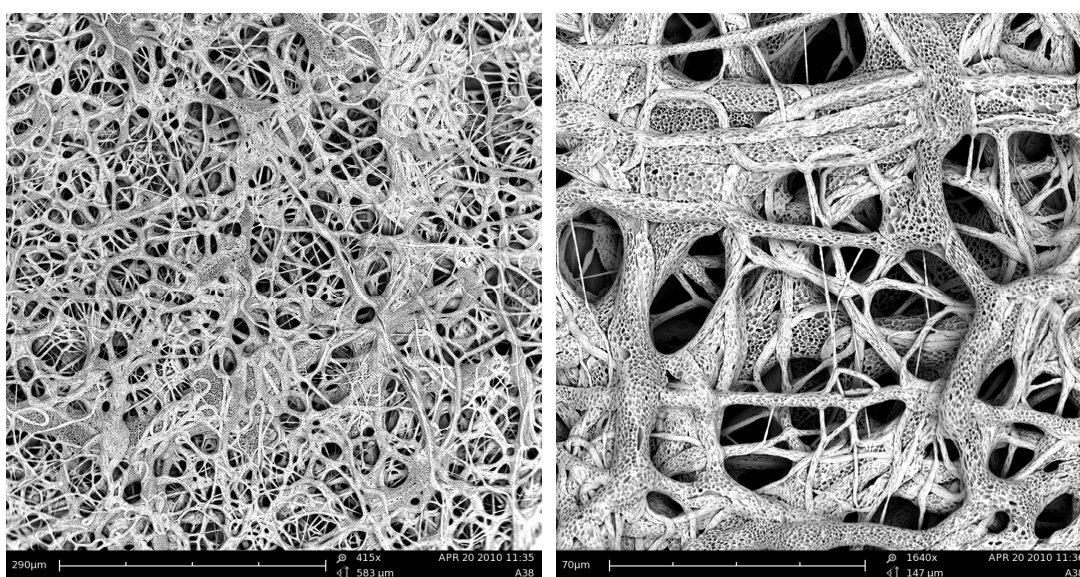
Obr. 10 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 92/8 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/AA) a 3% K (99AA) v poměru 2:1 (obj.). Procesní parametry: 13 cm, 40 kV.





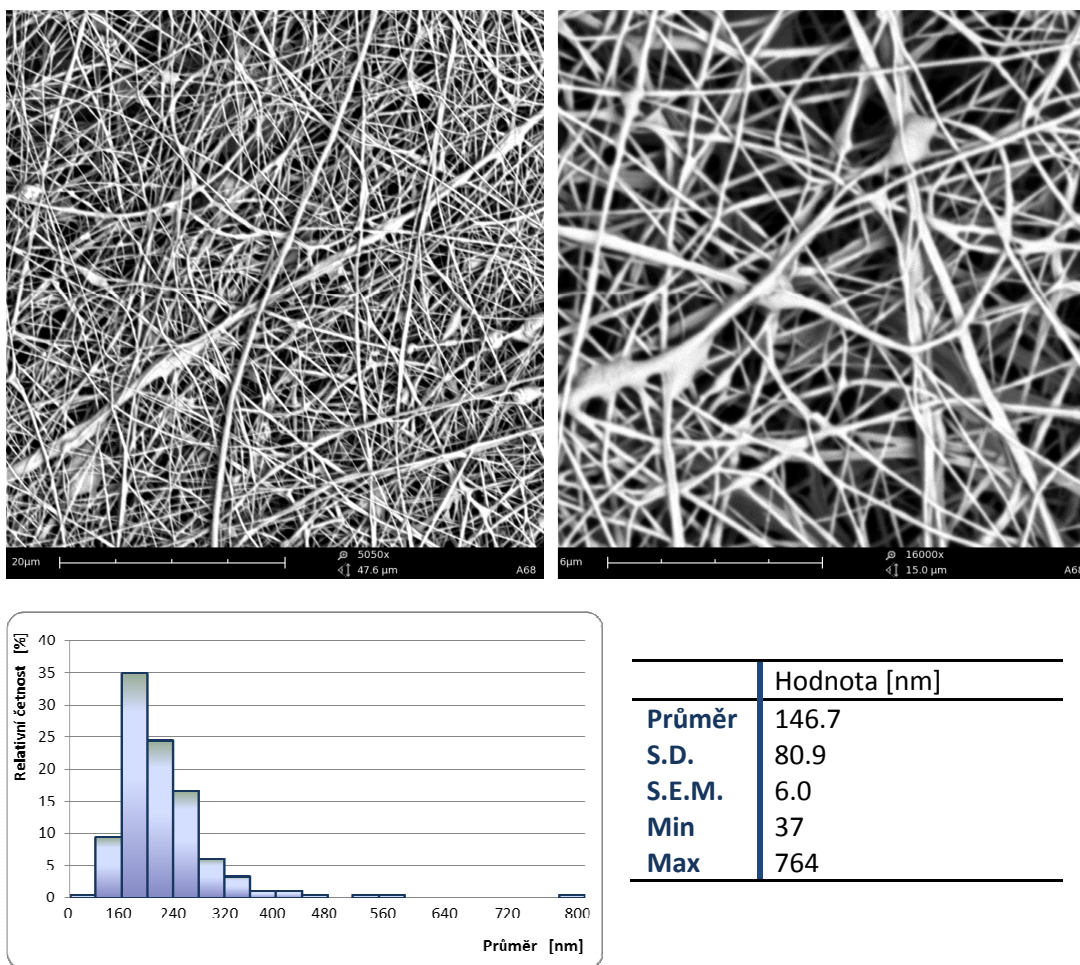
	Hodnota [μm]
Průměr	1.37
S.D.	1.51
S.E.M.	0.12
Min	0.13
Max	9.16

Obr. 11 SEM snímky a charakteristiky nanovlákněné vrstvy PCL. Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) po 48 hodinách rozpouštění. Procesní parametry: 13 cm, 35 kV.

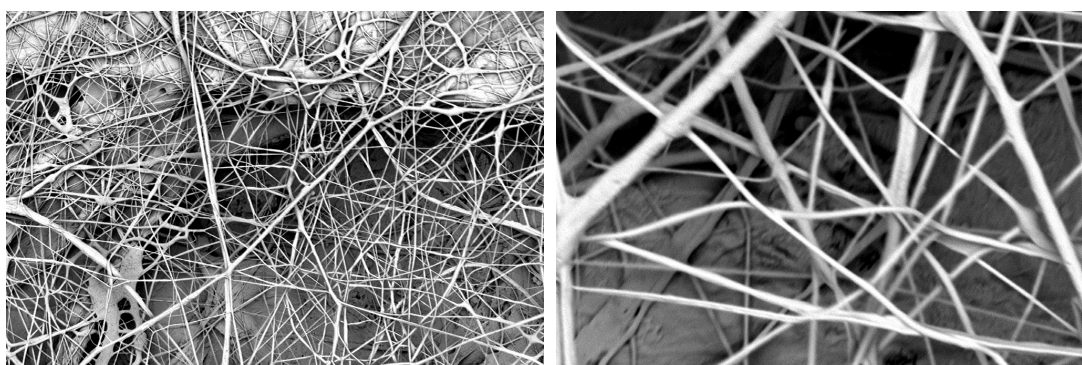


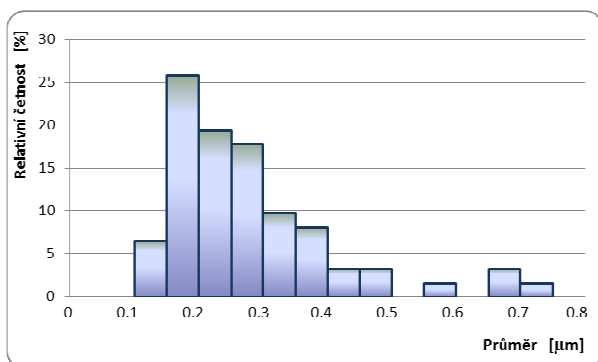
	Hodnota [μm]
Průměr	4.08
S.D.	3.37
S.E.M.	0.24
Min	0.58
Max	22.64

Obr. 12 SEM snímky a charakteristiky nanovlákněné vrstvy PCL. Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) po 120 hodinách rozpouštění. Procesní parametry: 13 cm, 36 kV.



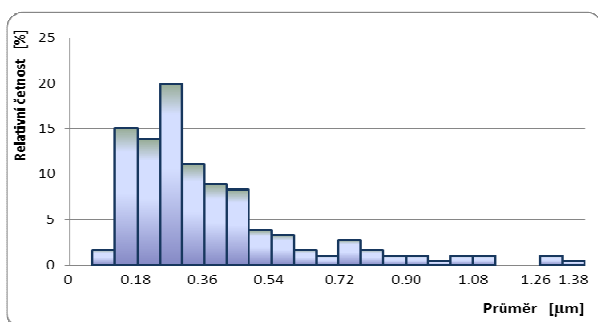
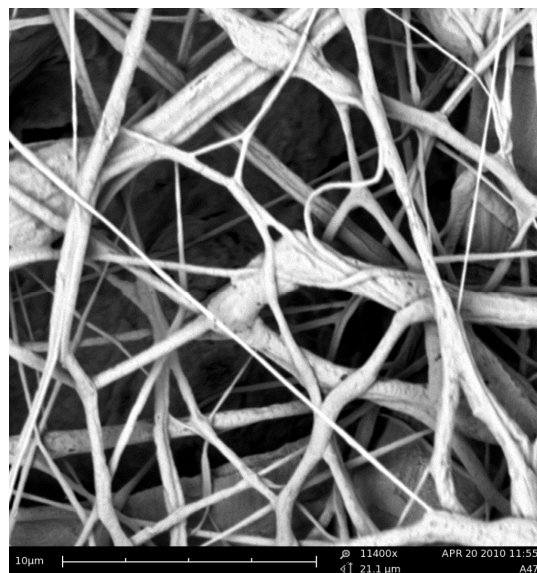
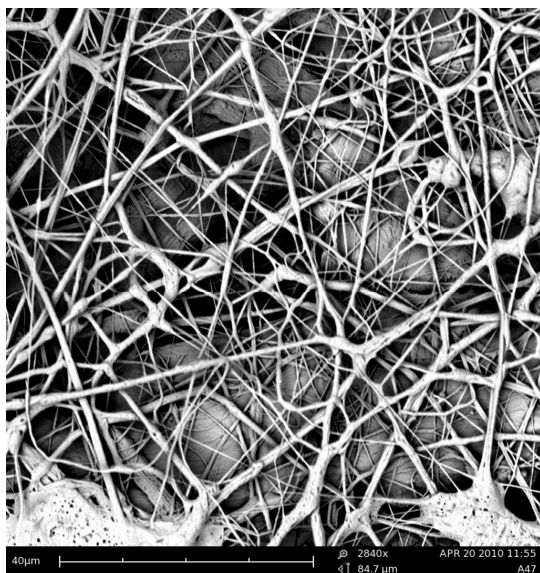
Obr. 13 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 3% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 15 cm, 35 kV.





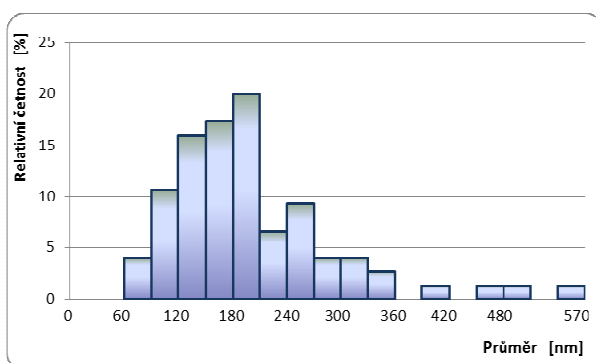
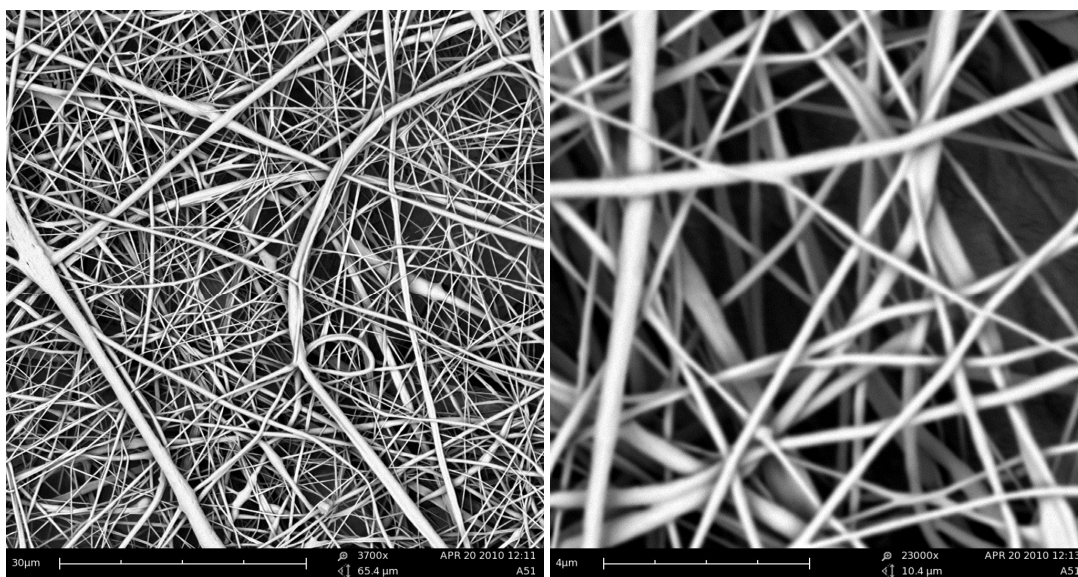
	Hodnota [nm]
Průměr	282.9
S.D.	131.4
S.E.M.	16.7
Min	110
Max	740

Obr. 14 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 3% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 15 cm, 40 kV.



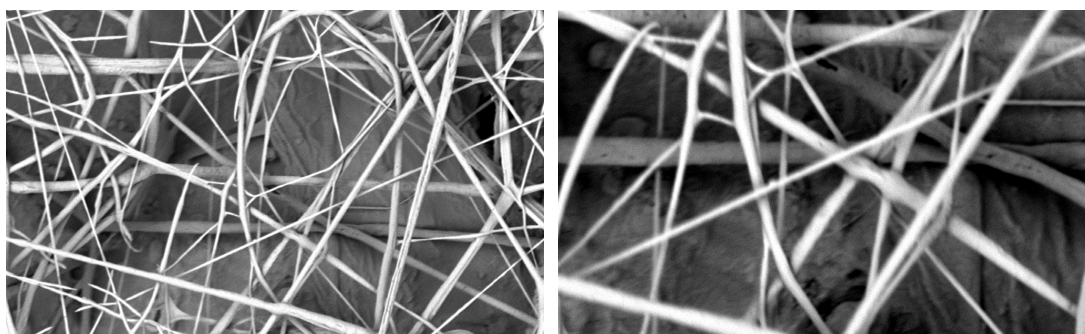
	Hodnota [nm]
Průměr	377.9
S.D.	246.6
S.E.M.	18.4
Min	90
Max	1332

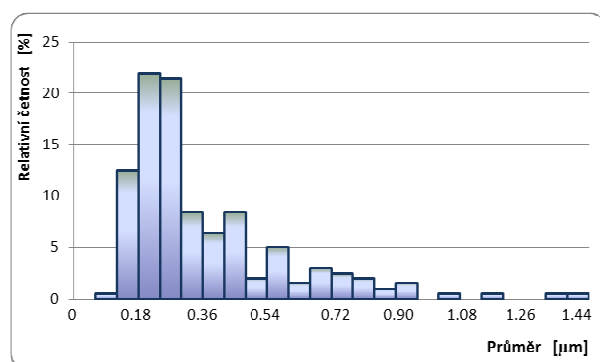
Obr. 15 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 3% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 15 cm, 45 kV.



	Hodnota [nm]
Průměr	202.2
S.D.	92.3
S.E.M.	10.6
Min	67.3
Max	556.9

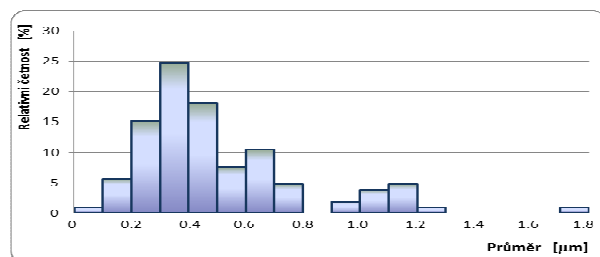
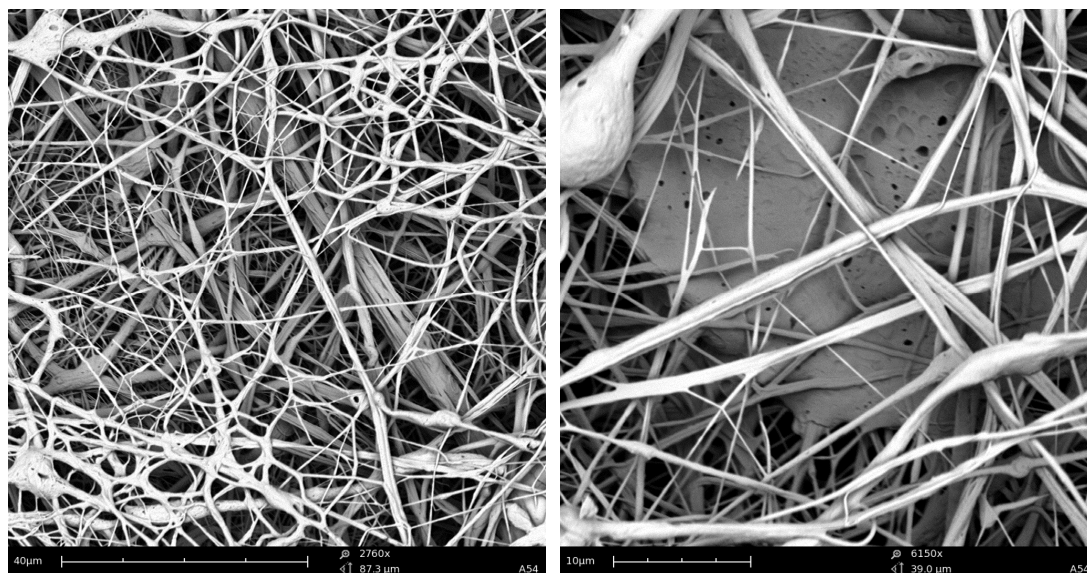
Obr. 16 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 78/22 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 5% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 15 cm, 35 kV.





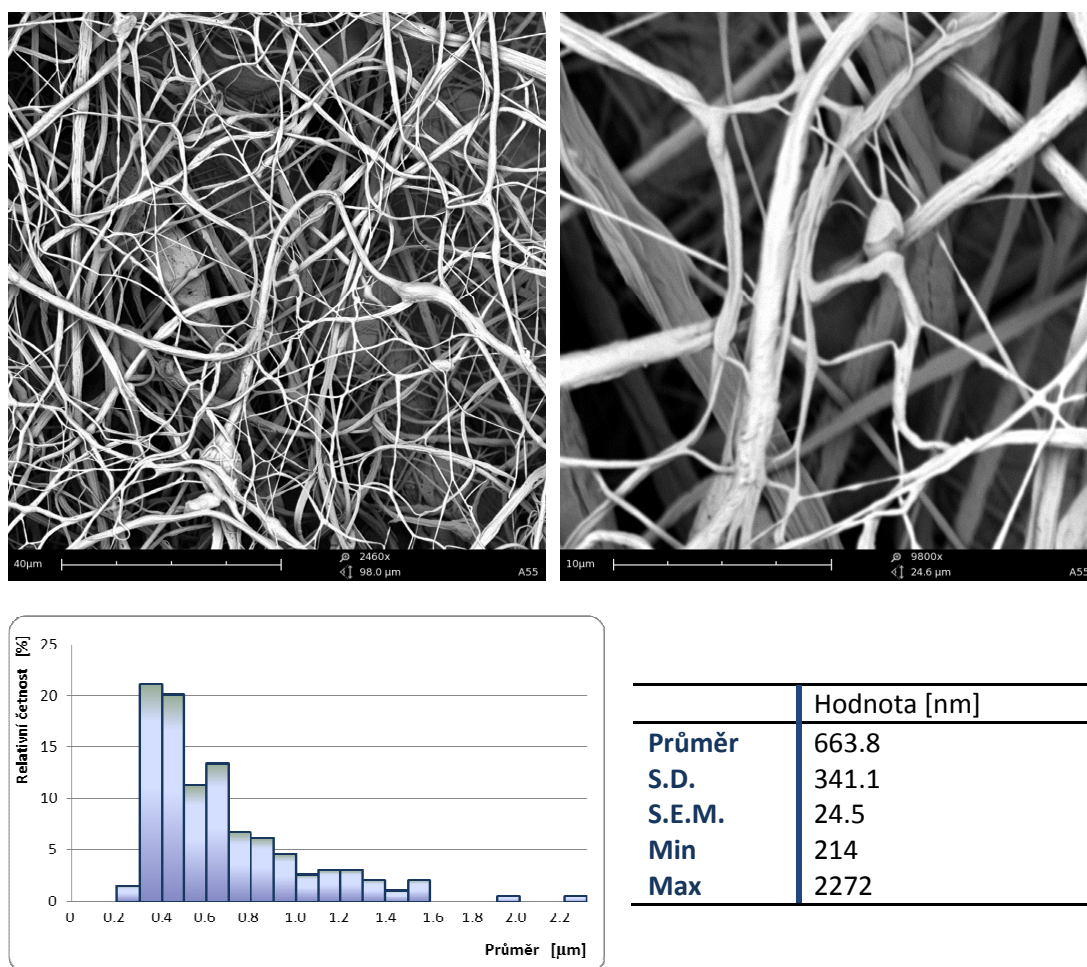
	Hodnota [nm]
Průměr	365.1
S.D.	225.8
S.E.M.	15.9
Min	120
Max	1429

Obr. 17 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 78/22 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 5% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 15 cm, 40 kV.

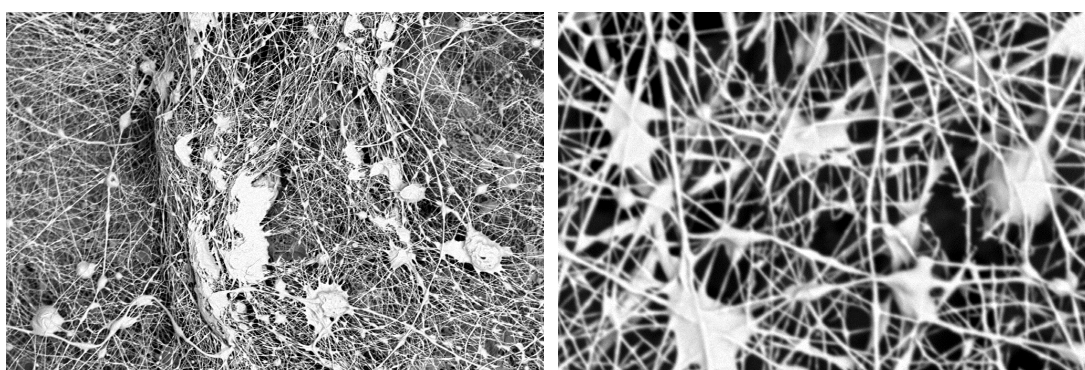


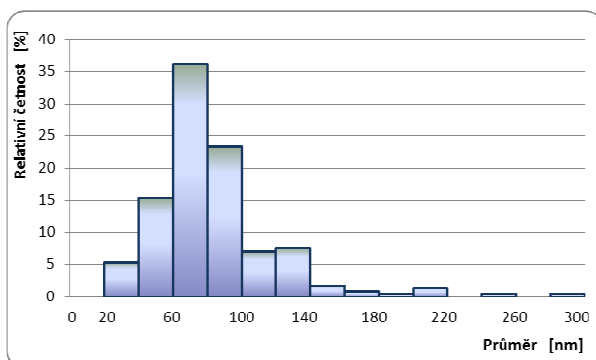
	Hodnota [nm]
Průměr	507.9
S.D.	290.3
S.E.M.	28.3
Min	76.6
Max	1733.9

Obr. 18 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 78/22 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 5% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 15 cm, 45 kV.



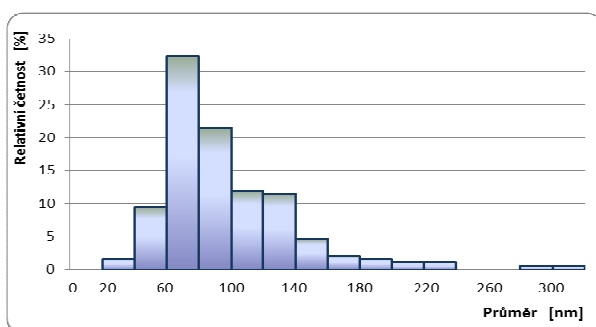
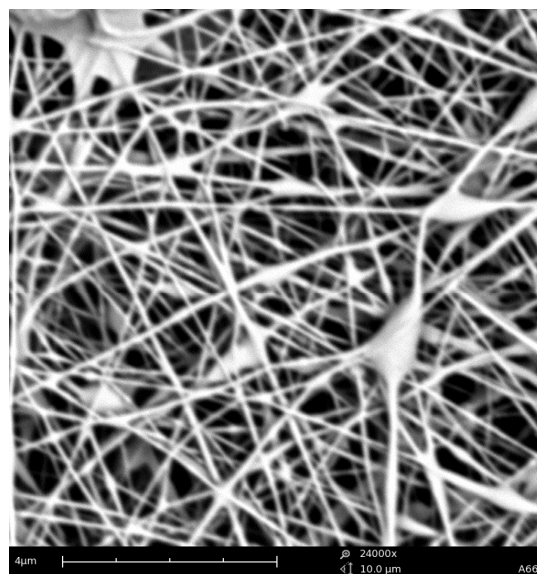
Obr. 19 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 78/22 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 5% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 15 cm, 50 kV.





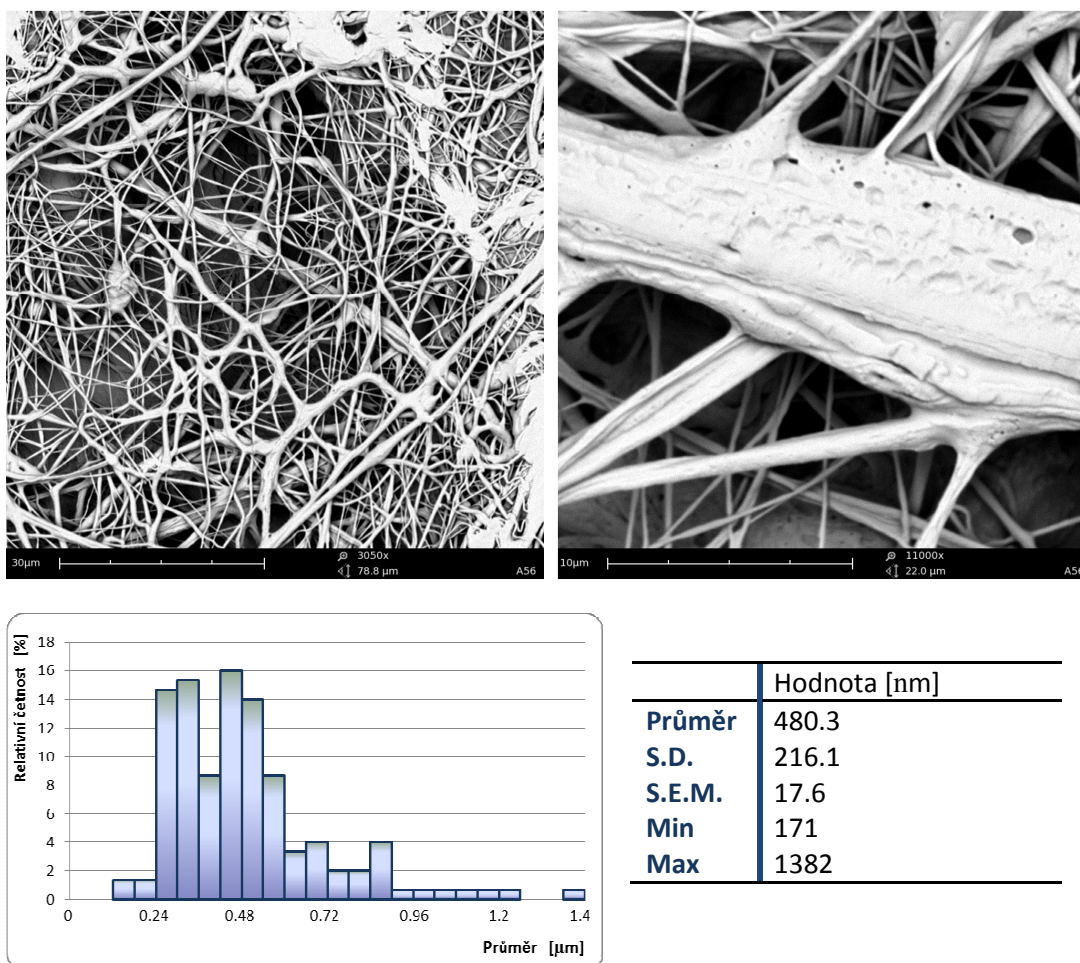
	Hodnota [nm]
Průměr	83.8
S.D.	35.7
S.E.M.	2.4
Min	31
Max	287

Obr. 20 SEM snímky a charakteristiky nanovlákněné vrstvy PCL/K 71/29 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 5% K (86AA) v poměru 2:1 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 35 cm, 50 kV.

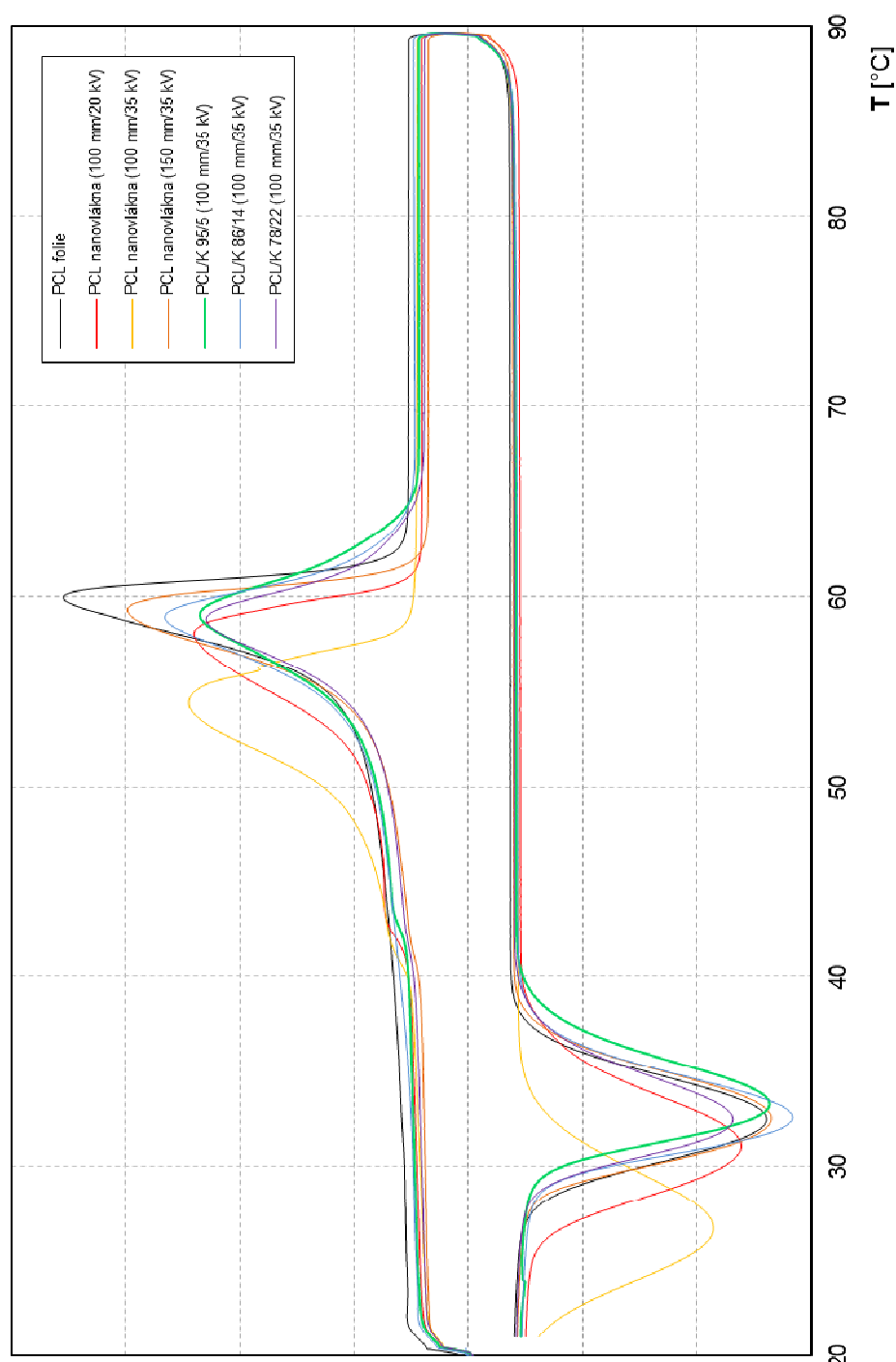


	Hodnota [nm]
Průměr	97.8
S.D.	42.4
S.E.M.	3.1
Min	38
Max	301

Obr. 21 SEM snímky a charakteristiky nanovlákněné vrstvy PCL/K 64/36 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 5% K (86AA) v poměru 2:3 (obj.). Zvláknění po dvou dnech mísení. Procesní parametry: 35 cm, 40 kV.



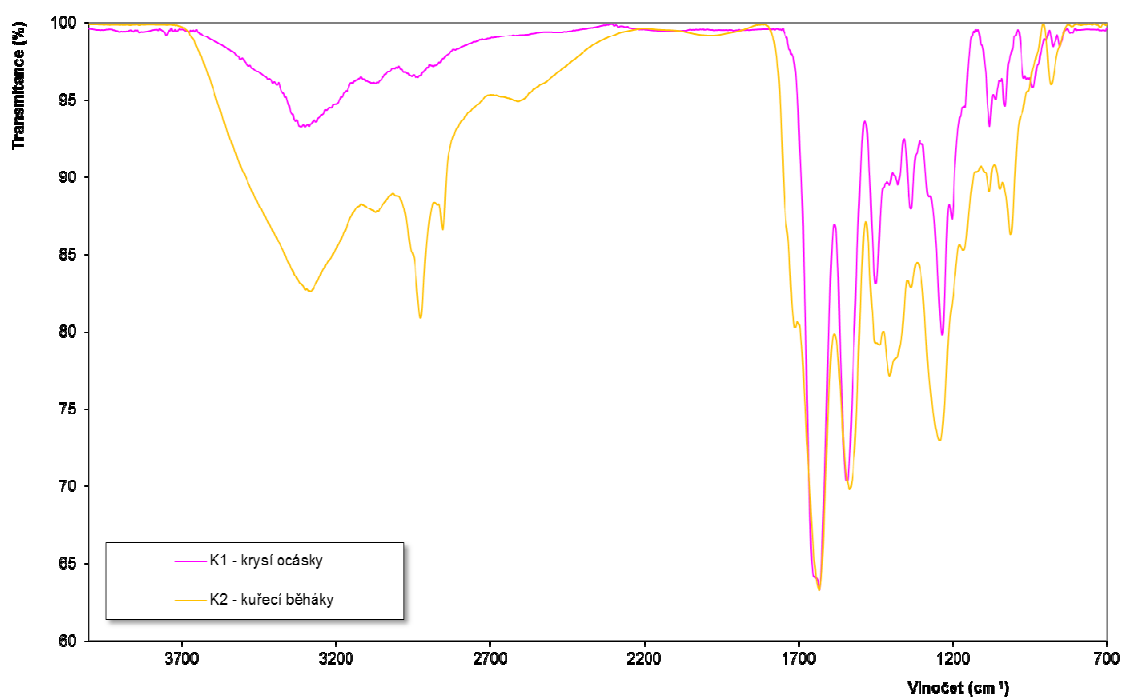
Obr. 22 SEM snímky a charakteristiky nanovláknenné vrstvy PCL/K 86/14 (%hm.). Zvlákněná z roztoků 18% PCL (THF/DMSO) a 3% K (86AA) v poměru 1:1 (obj.). Zvláknění popětí dnůh mísení. Procesní parametry: 15 cm, 40 kV.

Příloha 4: **Výsledky DSC analýzy**

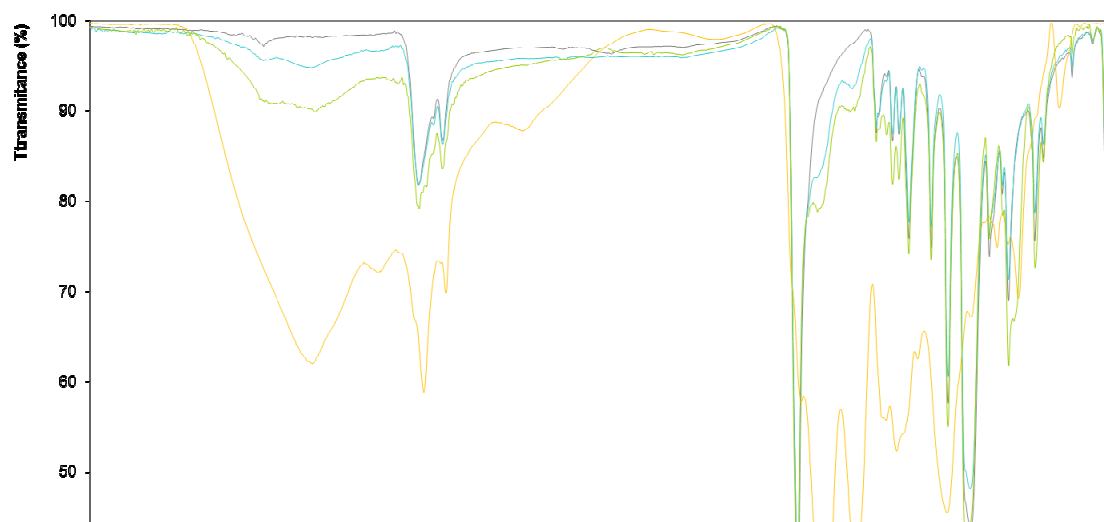
Graf P4-1 DSC křivky nanovláčkových vzorků PCL, PCL/K a srovnávacího vzorku - PCL fólie.

Tab. P4-1 Výsledky získané DSC analýzou nanovláknenných v vzorků PCL a PCL/K a srovnávacího vzorku – PCL fólie.

k	1. onset						2. vrchol: Tání						
	x (°C)	y (mW)	x1 (°C)	y1 (mW)	x2 (°C)	y2 (mW)	peak (°C)	area (mJ)	ΔH (J/g)	x1 (°C)	y1 (mW)	x2 (°C)	y2 (mW)
							59,98	741,45	80,592	49,329	24,1604	63,303	22,7683
20kV	43,09	23,6764	42,118	23,238	44,364	23,6851	58,098	686,585	71,519	45,589	23,7031	62,194	22,114
35kV	41,68	23,4572	40,885	23,059	42,451	23,5249	54,436	714,49	75,209	43,199	23,6257	59,465	22,4778
35kV	42,09	22,5867	41,023	22,3724	42,996	22,655	59,327	728,821	75,919	48,305	23,2164	62,938	21,9044
	43,29	23,3013	42,567	23,0278	44,669	23,3942	59,02	727,636	75,014	46,093	23,4988	66,702	22,1984
							58,929	722,811	74,517	43,972	23,6413	66,836	22,3661
	42	22,7047	41,781	22,6526	43,608	22,8542	58,862	610,006	62,887	48,21	23,2745	66,548	22,0269
	3. vrchol: Krystalizace												
							peak (°C)	area (mJ)	ΔH (J/g)	x1 (°C)	y1 (mW)	x2 (°C)	y2 (mW)
							32,503	-709,72	-77,144	25,132	17,8164	39,241	18,0697
							31,072	-734,974	-76,56	23,404	17,4017	40,281	17,6803
							26,824	-646,743	-68,078	21,019	16,9192	36,325	17,1779
							32,582	-729,39	-75,978	25,437	17,6915	39,866	17,9798
							33,252	-677,996	-69,896	26,568	17,5872	41,957	17,8851
							32,589	-695,715	-71,723	26,092	17,4683	40,464	17,7826
							32,49	-598,546	-61,706	25,744	17,7384	41,308	17,9633

Příloha 5: FTIR spektra

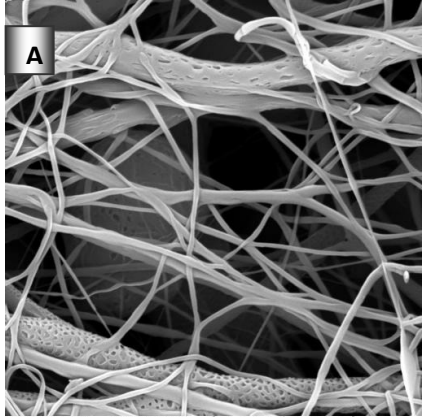
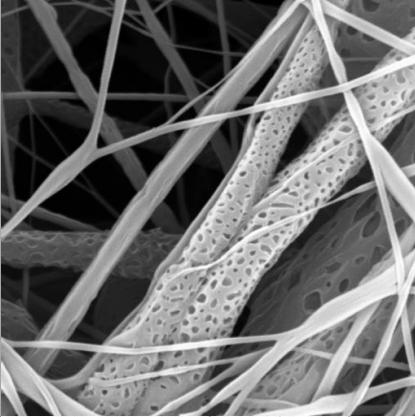
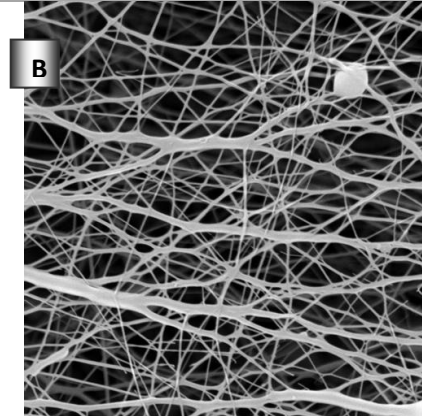
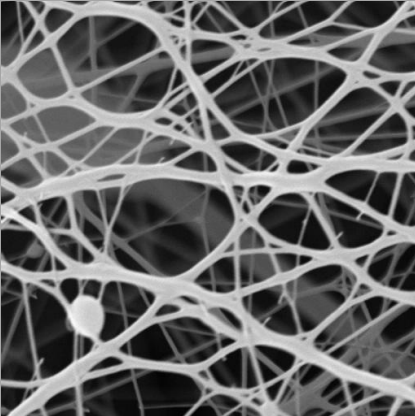
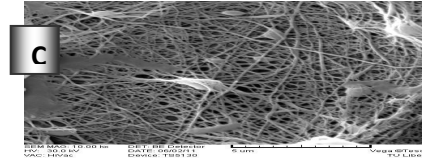
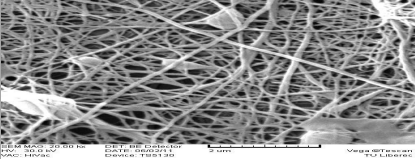
Graf P5.1 FTIR spektra kolagenů K1 a K2.

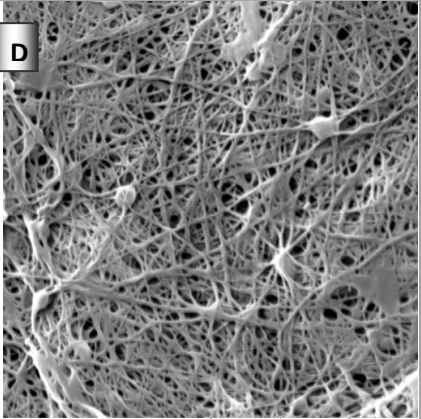
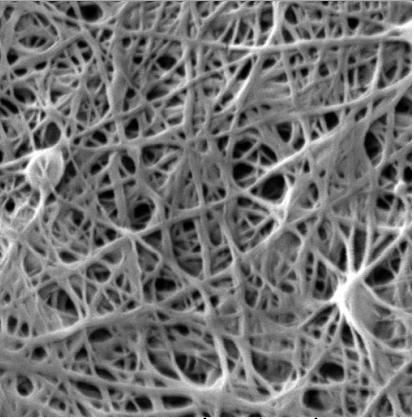
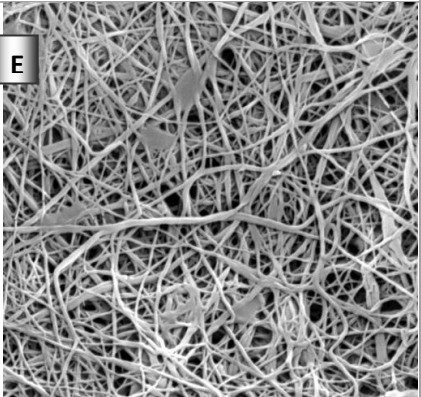
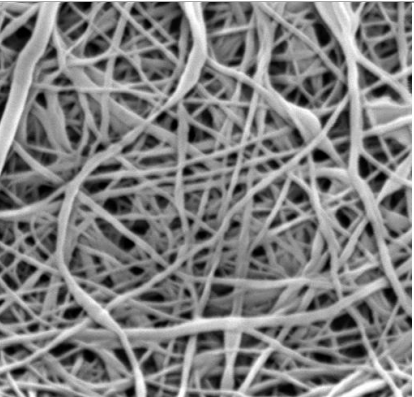
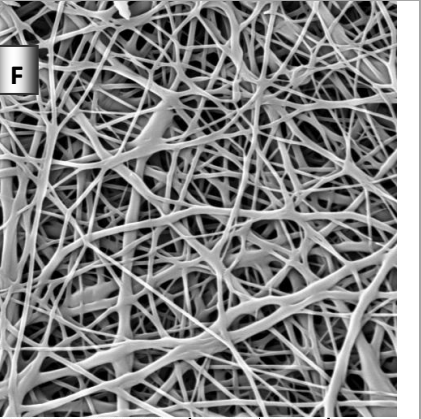
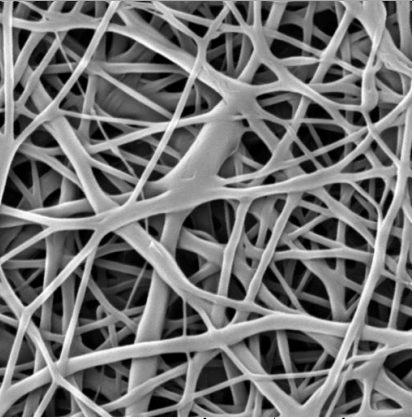


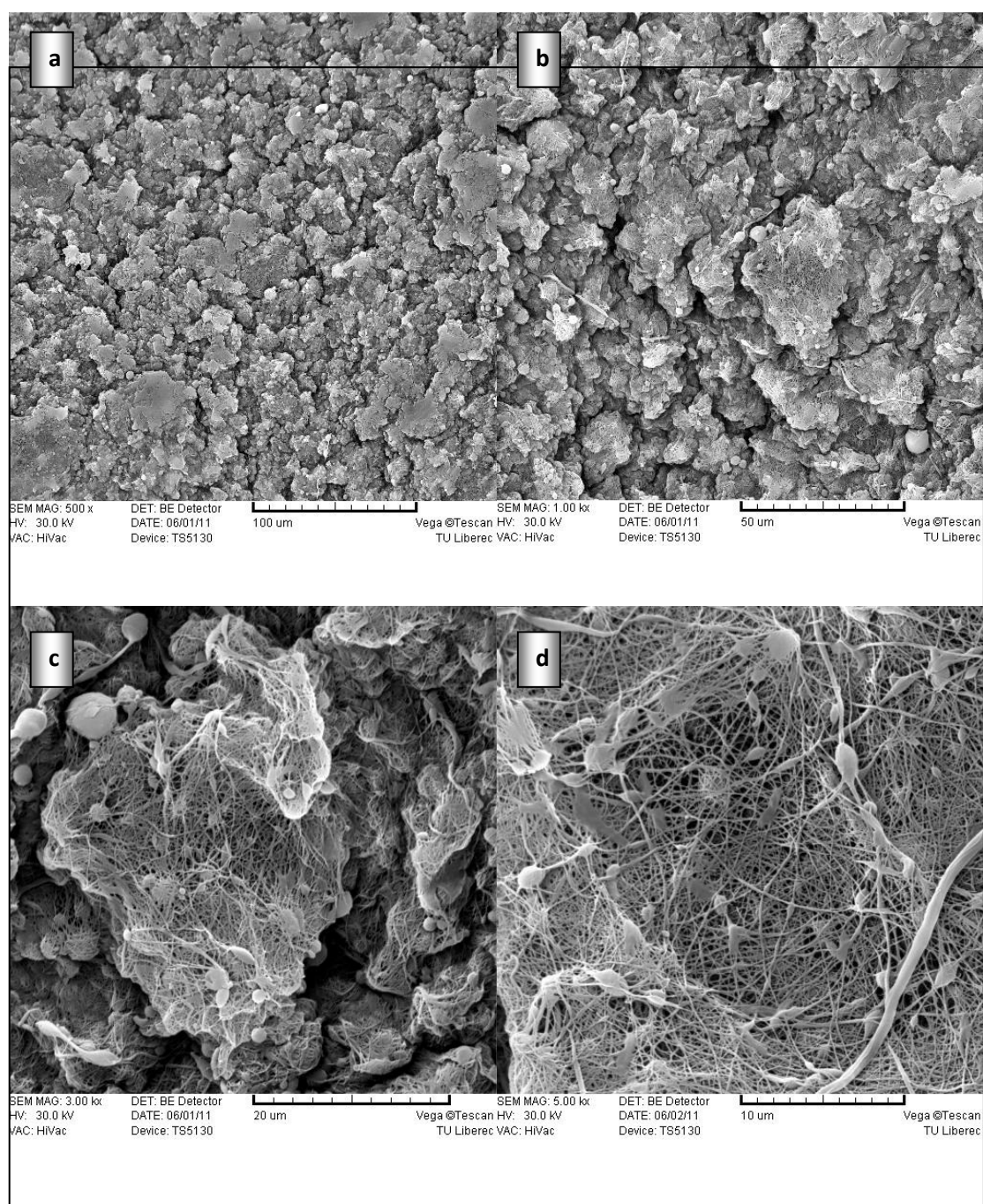
Graf P5.2 Porovnání FTIR spekter vzorků s maximálním prokázáním obsahu kolagenu připravených roubovací polymerací a elektrostatickým zvlákňováním směsi biopolymerů.

Příloha 6: **Materiály pro testy tkáňového růstu**

Tab. P6-1 SEM snímky a charakteristiky vzorků použitých pro testování na růst buněk MG-63 a jako substrát pro plazmatickou funkcionalizaci. (Elektronový mikroskop Vega TESCAN, zvětšení 5kx a 10kx (A, B, F) nebo 10kx a 20kx (C, D, E).)

 <p>SEM MAG: 5.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac DET: BE Detector DATE: 06/01/11 Device: TS5130 10 um Vega ©Tescan TU Liberec</p>	 <p>SEM MAG: 10.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac DET: BE Detector DATE: 06/01/11 Device: TS5130 5 um Vega ©Tescan TU Liberec</p>	<p>Průměr: 413 nm S.D.: 448.2 nm S.E.M.: 3.7 nm MIN: 186 nm MAX: 3019 nm</p> <p>*pozn.: Vrstva použita jako substrát pro vzorky G – M.</p>
 <p>SEM MAG: 5.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac DET: BE Detector DATE: 06/01/11 Device: TS5130 10 um Vega ©Tescan TU Liberec</p>	 <p>SEM MAG: 10.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac DET: BE Detector DATE: 06/01/11 Device: TS5130 5 um Vega ©Tescan TU Liberec</p>	<p>Průměr: 174.1 nm S.D.: 67.6 nm S.E.M.: 5.7 nm MIN: 90 nm MAX: 2460 nm</p>
 <p>SEM MAG: 5.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac DET: BE Detector DATE: 06/01/11 Device: TS5130 10 um Vega ©Tescan TU Liberec</p>	 <p>SEM MAG: 10.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac DET: BE Detector DATE: 06/01/11 Device: TS5130 5 um Vega ©Tescan TU Liberec</p>	<p>Průměr: 75.2 nm S.D.: 32 nm S.E.M.: 1.8 nm MIN: 32 nm MAX: 218 nm</p>

 <p>SEM MAG: 10.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac</p> <p>DET: BE Detector DATE: 06/02/11 Device: TS5130</p> <p>5 μm</p> <p>Vega ©Tescan TU Liberec</p>	 <p>SEM MAG: 20.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac</p> <p>DET: BE Detector DATE: 06/02/11 Device: TS5130</p> <p>2 μm</p> <p>Vega ©Tescan TU Liberec</p>	<p>Průměr: 116.1 nm S.D.: 28.1 nm S.E.M.: 2.0 nm MIN: 50.4 nm MAX: 230 nm</p>
 <p>SEM MAG: 10.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac</p> <p>DET: BE Detector DATE: 06/02/11 Device: TS5130</p> <p>5 μm</p> <p>Vega ©Tescan TU Liberec</p>	 <p>SEM MAG: 20.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac</p> <p>DET: BE Detector DATE: 06/02/11 Device: TS5130</p> <p>2 μm</p> <p>Vega ©Tescan TU Liberec</p>	<p>Průměr: 123.7 nm S.D.: 26.4 nm S.E.M.: 2.0 nm MIN: 68.9 nm MAX: 224.9 nm</p>
 <p>SEM MAG: 5.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac</p> <p>DET: BE Detector DATE: 06/02/11 Device: TS5130</p> <p>10 μm</p> <p>Vega ©Tescan TU Liberec</p>	 <p>SEM MAG: 10.00 kx HV: 30.0 kV VAC: HiVac</p> <p>DET: BE Detector DATE: 06/02/11 Device: TS5130</p> <p>5 μm</p> <p>Vega ©Tescan TU Liberec</p>	<p>Průměr: 330 nm S.D.: 239 nm S.E.M.: 19.5 nm MIN: 94 nm MAX: 1188 nm</p>

Příloha 7: **Mikrostruktura vzorku C**

Obr. P7.1 SEM snímky zvlněné mikrostruktury povrchu vzorku C vzniklého po 3 dnech vymývání. Elektronový mikroskop Vega TESCAN, zvětšení (a) 500x, (b) 1kx, (c) 3kx, (d) 5kx.

Příloha 8: Postupy a materiály použité v kapitole kapitoly C**1. Použité chemikálie****Fosfátový pufr (PBS)**

PBS (phosphate buffered saline) je v biologii běžně používaný pufr sloužící k udržení konstantního pH. Pro přípravu roztoku byla rozpuštěna jedna tableta v 200 ml H₂O (dionizované). Byl získán roztok PBS o pH 7,2 – 7,4. Připravený roztok obsahoval 0,01 M fosfátového pufru, $2,7 \cdot 10^{-3}$ M chloridu draselného (KCl) a 0,137 M chloridu sodného (NaCl).

Trypsin

Trypsin je trávicí enzym dvanácterníku patřící mezi hydrolázy (proteázy). Vzniká ve slinivce břišní jako proenzym trypsinogen a je aktivován enterokinázou dvanácterníku. Trypsin je schopen štěpit peptidické vazby bílkovin. Ke štěpení nedochází na náhodných místech, ale pouze na karboxylovém konci aminokyselin lysinu a argininu (pokud po nich následuje prolin). (*Trypsin, n. d.*)

V tkáňovém inženýrství se používá k tzv. trypsinaci – uvolnění buněčné kultury z podkladů a jejímu rozvolnění.

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

EDTA je polyaminokarboxylová kyselina se vzorcem $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$. EDTA je chelační činidlo schopné sekvencovat kationty (Ca^{2+} , Fe^{3+} atd.). Ty po navázání zůstávají v roztoku, ale vykazují sníženou reaktivitu (*EDTA, n. d.*) Při typizaci se EDTA využívá k podpoře účinku trypsinu vyvázáním vápníku, který se podílí na adhezi buněk povrchu.

DMEM

Dulbeccovo modifikované Eaglovo medium je buněčný kultivační roztok obsahující aminokyseliny, soli, glukózu a vitamíny. Kromě toho obsahuje železo a fenolovou červen, která souží jako indikátor pH. Toto kultivační médium je vhodné pro většinu typů buněk, včetně lidských. (*EMEM, n. d.*)

Fetální bovinní sérum (FS)

FS je část krevní plasmy zůstávající po koagulaci krve (přeměna proteinu fibrinogenu na fibrin). Získává se z bovinních zárodků na jatkách a je to současně nejvyužívanější doplněk séra užívaný pro in vitro kultivaci eukaryotních buněk. Jeho hlavní složkou je albumin, kromě toho obsahuje řadu růstových faktorů a málo protilátek. (*FS, n. d.*)

Trypanová modř

Trypanová modř ($C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$) je vitální barvivo náležící mezi azobarviva, která selektivně barví odumřelou tkáň (buňky). U mrtvých buněk s poškozenou buněčnou membránou je toto barvivo schopné pronikat dovnitř, zatímco živé buňky zůstávají nezbarvené. (*TB, n. d.*)

Alexa Fluor[®] 488

Alexa Fluor[®] 488 (fa Molecular Probes) je fluorescenční barvivo s excitačním maximem 495 nm a emisním maximem 519 nm. Toto barvivo je schopné navázat aminokyseliny na povrchu buněk a barví jejich membránu a cytoplazmu azurově zeleně. (*AF, n. d.*) Pro barvení byl připraven roztok v DMSO o koncentraci 1 mg/ml, který byl dále ředěn PBS (200 x).

Imunofluorescenční barviva

Pro imunofluorescenční barvení alkalické fosfatázy (ALP) byla použita primární protilátka monoklonální anti – ALP myši ascitická tekutina – klon 8B6 (isotyp myších IgG2a) (fa Sigma Aldrich). Tato protilátka je schopná reagovat s isoenzymy alkalické fosfatázy lidské placenty (hALP). Pro barvení byla ředěna PBS v poměru 1:200. Jako sekundární protilátka byl použit F(ab')₂ fragment protilátky IgG proti myšímu antigenu, která byla vytvořena v organismu kozy a konjugována s Alexa Fluor[®] 488 („Alexa Fluor[®] 488 – conjugated goat anti-mouse IgG (H+L)”) (fa Molecular Probes[®]). Pro barvení byla ředěna v poměru 1:400.

Pro imunofluorescenční barvení osteokalcinu byla použita primární protilátka polyklonální králíčí anti-osteokalcin (1-49, lidský) IgG (fa Peninsula Laboratories Inc.). Pro barvení bylo ředěno v poměru 1:200. Jako sekundární protilátka byl použit

F(ab')₂ fragment protilátky IgG proti králičímu antigenu, která byla vytvořena v organismu kozy a konjugována s barvivem Alexa Fluor[®]488 („Alexa Fluor[®]488 – conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)”) (fa Molecular Probes[®]). Pro barvení bylo ředěno v poměru 1:400.

2. Použité postupy

Nasazení buněk

Při získávání kultury pro buněčné testy se aplikuje následující postup

- (1) Buňky v kultivační lahvi jsou opláchnuty roztokem PBS a do lahvičky s buňkami je přidávána směs trypsinu/EDTA a obsah je mírně promíchán.
- (2) Následuje inkubace při standartních podmínkách. (37 °C, 5% CO₂, nasycená vlhkost vzduchu) po dobu několika minut. Během ní dochází k oddělení buněk ze dna lahve.
- (3) K získané buněčné suspenzi je následně přidáno kultivační médium DMEM + 10% FS (cca 3 ml) a suspenze je centrifugována (5 min, 1000 ot./min.).
- (4) Po odebrání supernatantu se k sedimentu přidává kultivační médium (DMEM + 10% FS) a počítá se kultivační hustota. Roztok kultivačního média s buňkami se dále ředí dle potřeby.

Pro kultivaci byla použita koncentrace 60.10³ buněk/1 ml. Do každé kultivační cely byl umístěn 1 ml buněčného roztoku a 0,5 ml kultivačního média (DMEM + 10% FS).

Počítání buněk

Zjišťování hustoty buněčné populace v testovacích dnech se provádělo počítáním v Bürkerových komůrkách. Před počítáním buněk byl, stejně jako v případě buněčného roztoku, proveden oplach vzorku pokrytého buněčnou kulturou v PBS a následně trypsinace. Pro počítání byla připravena směs 0,5 ml suspenze buněk uvolněných z podkladu v trypsinu/EDTA a 0,5 ml 0,4% trypanové modři. Trypanová modř posloužila k odlišení mrtvých a živých buněk a umožnila následný výpočet jejich viability. Pro počítání byla každá komůrka vyplněna připraveným obarveným roztokem. U každého vzorku bylo v daný testovací den provedeno měření ze tří

kultivačních jamek. K počítání sloužil optický mikroskop Olympus IX71 (digitální kamera DP71). Ze získaných hodnot byl stanoven průměrný počet buněk na cm^2 vzorku a průměrná viabilita (%). Ta byla vypočtena dle vzorce

$$V = \frac{n_z}{n} \cdot 100, \quad (1)$$

jako podíl živých (n_z) z celkového počtu buněk (n).

Fluorescenční mikroskopie

Pře fluorescenční mikroskopii byl vzorek s buněčnou kulturou opláchnut PBS. Následovala fixace ve 2% roztoku paraformaldehydu a barvení. Pro barvení bylo použito barvivo Alexa Fluor[®]488. (1 mg/ml v DMSO, ředěné 200 PBS). Pro fluorescenční mikroskopii byl použit mikroskop Olympus IX71 (digitální kamera DP71; objektiv 20x).

Imunofluorescenční barvení

Barvení primárními protilátkami pro OC a ALP bylo prováděno přes noc v chladu (umístěno v lednici). Následoval oplach PBS (3x) a barvení sekundárními protilátkami po dobu 90 minut. Vzorky byly poté opět opláchnuty PBS (3x) a v tomto roztoku byly také uchovány. Jejich sledování bylo provedeno na konfokálním mikroskopu Leica DMIRE² (obj. 20x). Při sledování byl vzorek umístěn stranou pokrytou buňkami na kapce destilované vody.

Použité zdroje

AF, n.d. *Alexa Fluor*. [online] [Cit. 9. 8. 2011]

Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Alexa_Fluor>

EMEM, n.d. *Eagle's minimal essential medium*. [online] [Cit. 6. 8. 2011]

Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Eagle's_minimal_essential_medium>

FS, n.d. *Fetal bovine serum*. [online] [Cit. 6. 8. 2011]

Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fetal_bovine_serum> [Cit. 6. 8. 2011]

Trypsin, n.d. *Trypsin*. [online] [Cit. 9. 8. 2011]

Dostupné na: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Trypsin>>

TB, n.d. *Trypan blue*. [online] [Cit. 6. 8. 2011]

Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/trypan_blue>

Příloha 9: **Výsledky testů buněčného růstu**

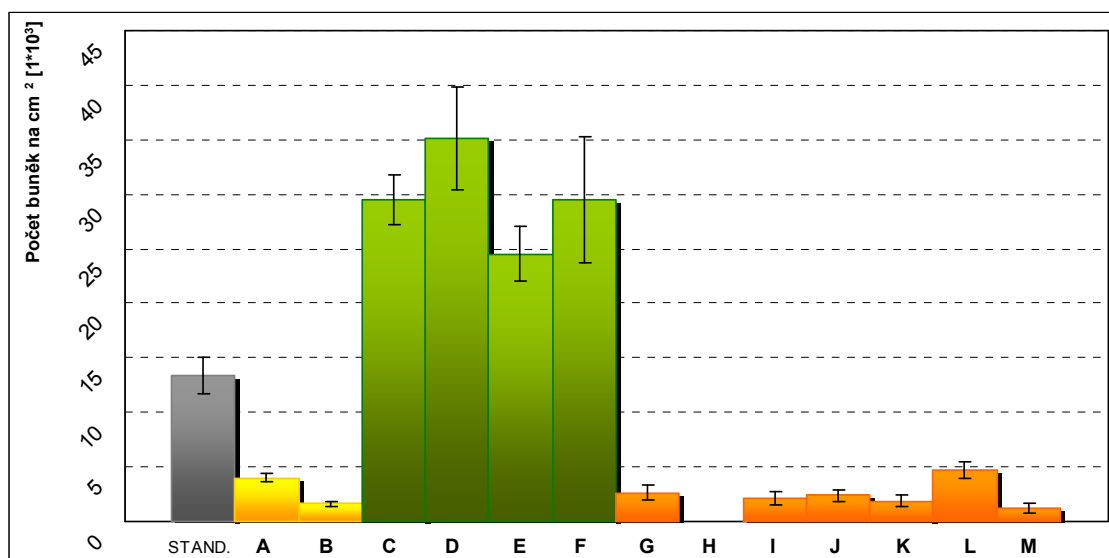
Tab. P9.1 Počty buněk v jednotlivých kontrolních dnech.

Vzorek	Doba kultivace [dny]	Počet buněk MG-63 [n/cm ²]		
		<i>průměr</i>	<i>SD</i>	<i>S.E.M</i>
STANDARD	1	13 426,34	4 152,57	1 695,28
	4	68 441,56	18 873,28	7 704,98
	8	398 860,40	168 604,70	39 740,50
A	1	4 008,34	1 064,95	434,77
	4	12 025,01	9 244,44	3 774,03
	8	44 702,02	19 514,07	7 966,59
B	1	1 650,49	577,55	235,78
	4	8 016,67	1 137,45	4 644,42
	8	140 965,50	68 559,39	18 323,27
C	1	29 473,07	5 473,05	2 234,36
	4	202 425,20	47 249,95	19 289,71
	8	556 689,32	148 278,32	34 949,54
D	1	35 131,90	11 577,00	4 726,29
	4	192 164,40	63 736,71	26 020,40
	8	444 925,40	113 249,60	26 693,20
E	1	24 521,59	6 177,37	2 521,90
	4	72 621,64	33 937,25	13 854,83
	8	443 510,70	114 320,50	26 945,60
F	1	29 473,07	14 073,79	5 745,60
	4	244 037,01	43 381,03	17 710,23
	8	442 803,38	148 904,05	35 097,02
G	1	2 593,63	1 653,86	675,18

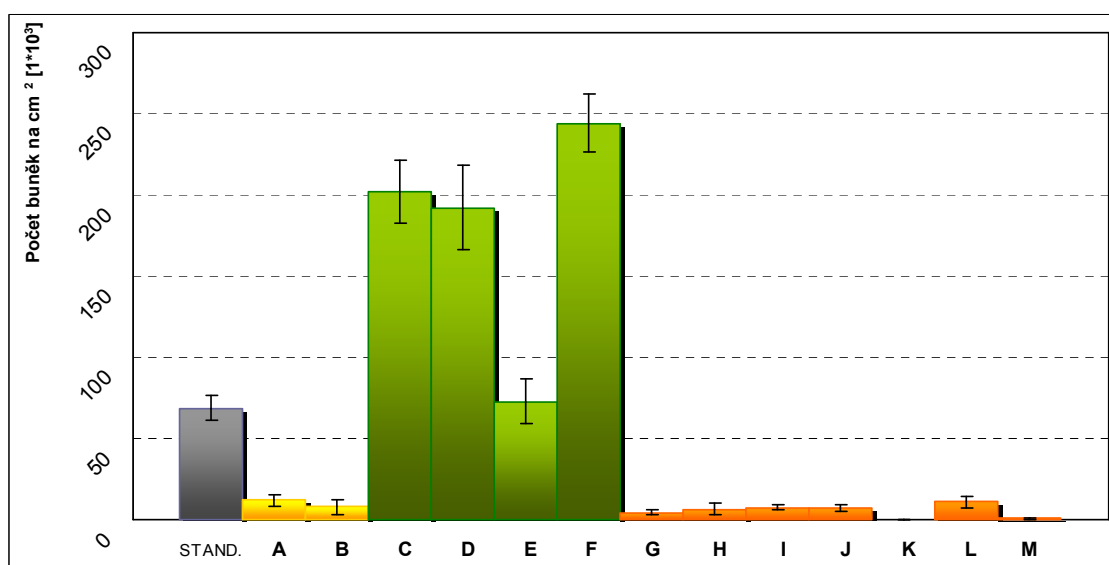
	4	4 527,06	3 067,01	1 371,61
	8	— [*]	—	—
H	1	0^{**}	0,00	0,00
	4	6 366,00	9 025,35	3 684,58
	8	—	—	—
I	1	2 122,06	1 483,76	605,74
	4	7 545,11	4 443,77	1 814,16
	8	—	—	—
J	1	2 357,84	1 461,10	596,49
	4	6 837,75	4 510,82	1 841,54
	8	5 894,61	6 660,56	2 719,20
K	1	1 886,28	1 155,10	471,57
	4	0,00	0,00	0,00
	8	—	—	—
L	1	4 715,69	1 713,30	699,45
	4	10 846,09	8 184,14	3 341,16
	8	23 814,20	10 973,48	4 479,91
M	1	1 178,92	1 064,95	434,77
	4	943,14	1 155,10	471,57
	8	—	—	—

* Měření nebylo provedeno.

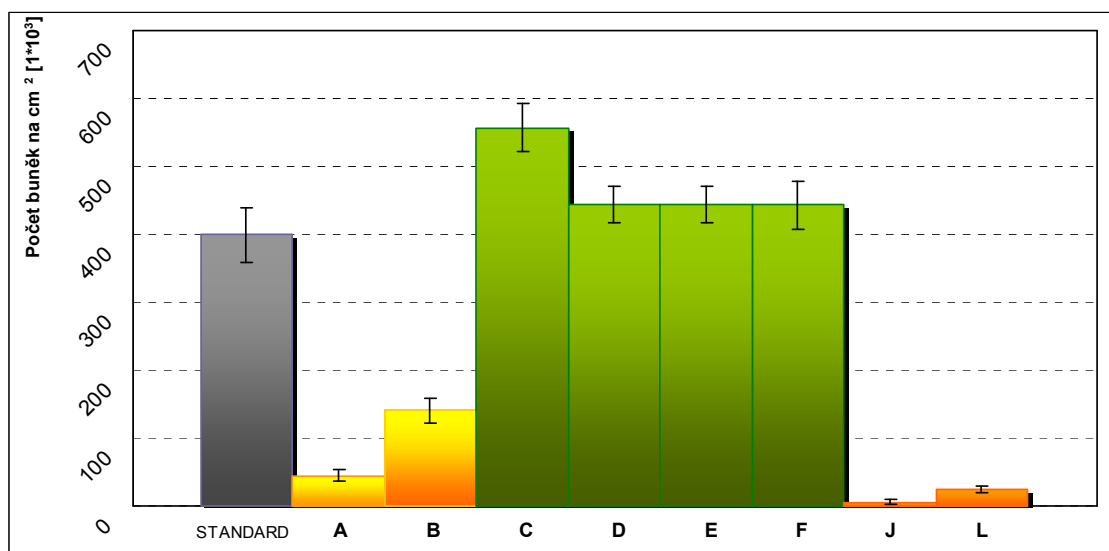
** Ačkoli při počítání buněk v Bürkerových komůrkách nebyly v tomto intervalu zjištěny, tuto hodnotu je možné pokládat pouze za téměř nulovou, a to vzhledem k výsledkům počítání ve 4 dni kultivace.



Graf P9.1 Počty buněk MG-63 na plochu 1cm² v prvním dni kultivace na nanovláknenných materiálech (průměr \pm S.E.M.). ■ PCL bez úpravy, ■ elektrostatické zvlákňování PCL ve směsi s kolagenem, ■ plazmatická úprava vrstvy a funkcionizace kolagenem.



Graf P9.2 Počty buněk MG-63 na plochu 1cm² ve čtvrtém dni kultivace na nanovláknenných materiálech (průměr \pm S.E.M.). ■ PCL bez úpravy, ■ elektrostatické zvlákňování PCL ve směsi s kolagenem, ■ plazmatická úprava vrstvy a funkcionizace kolag



Graf P9.3 Počty buněk MG-63 na plochu 1cm² v osmém dni kultivace na nanovláknenných materiálech (průměr ± S.E.M.). ■ PCL bez úpravy, ■ elektrostatické zvlákňování PCL ve směsi s kolagenem, ■ plazmatická úprava vrstvy a funkcionizace kolagenem.

Tab. P9.2 Viabilita buněk MG-63 na testovaných vzorcích po 1, 4 a 8 dnech kultivaci. Hodnoty jsou uvedeny v procentech [%] (průměr ± S.E.M.).

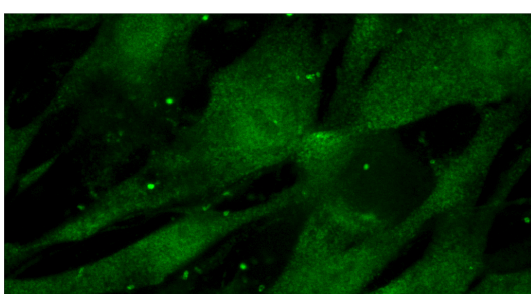
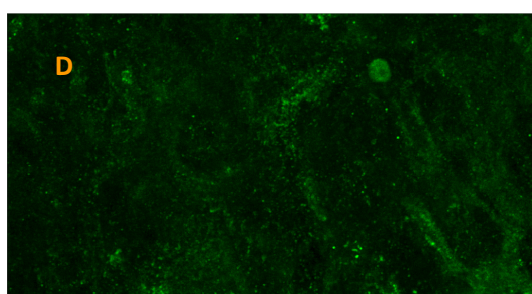
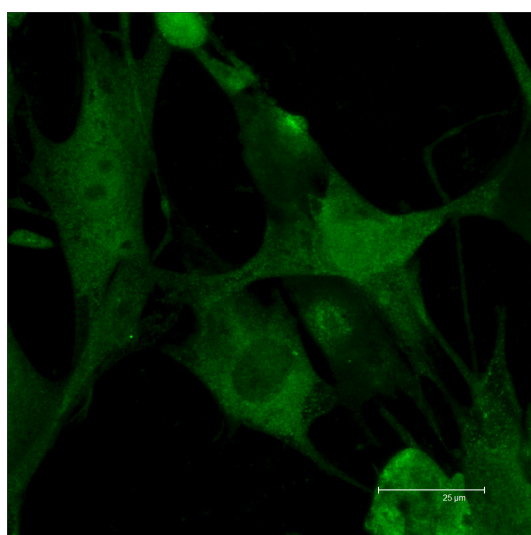
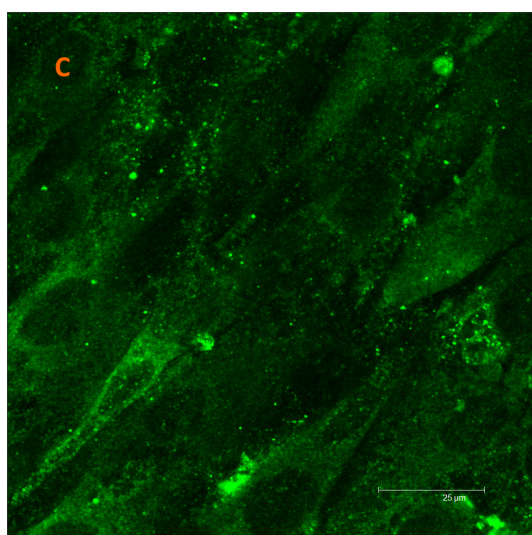
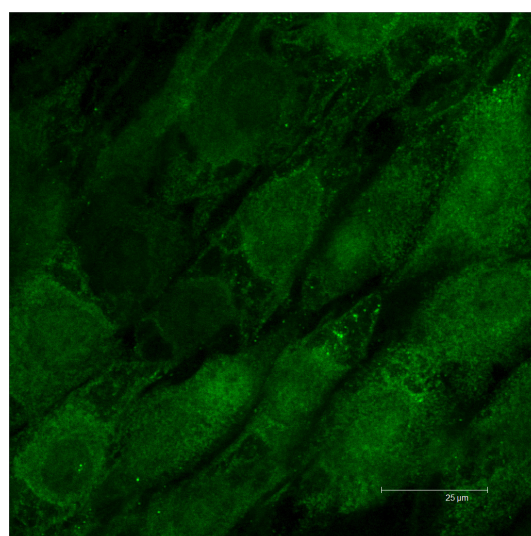
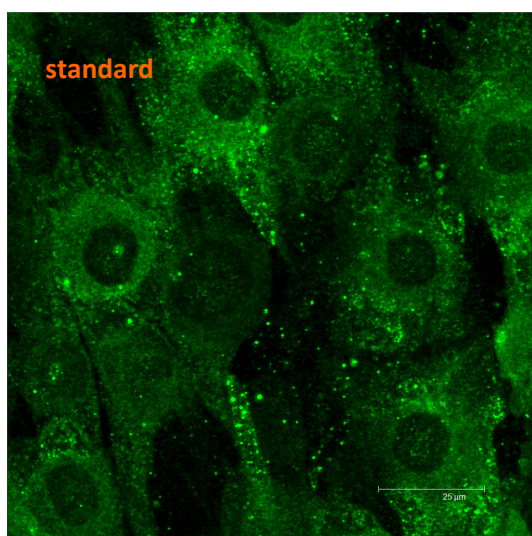
Vzorek	Doba kultivace		
	24 hod	4 dny	8 dní
STANDARD	82,47 ± 5,61	92,56 ± 2,56	84,37 ± 1,78
A	45,77 ± 9,72	52,11 ± 2,61	91,79 ± 1,75
B	19,63 ± 2,15	30,00 ± 14,00	91,50 ± 2,17
C	77,07 ± 4,24	92,27 ± 3,77	95,44 ± 0,59
D	80,28 ± 5,11	89,04 ± 1,94	92,84 ± 1,01
E	77,72 ± 3,88	89,00 ± 2,07	90,25 ± 1,23
F	87,79 ± 4,51	91,21 ± 0,99	62,83 ± 2,27
G	22,60 ± 6,37	38,52 ± 10,03	—
H	0	27,77 ± 9,60	—
I	22,51 ± 5,97	51,71 ± 6,70	—
J	22,4 ± 5,98	75,48 ± 8,41	41,71 ± 5,27
K	11,57 ± 2,65	0	—
L	45,60 ± 4,57	52,72 ± 5,94	61,40 ± 4,61
M	22,78 ± 8,18	22,78 ± 11,88	—

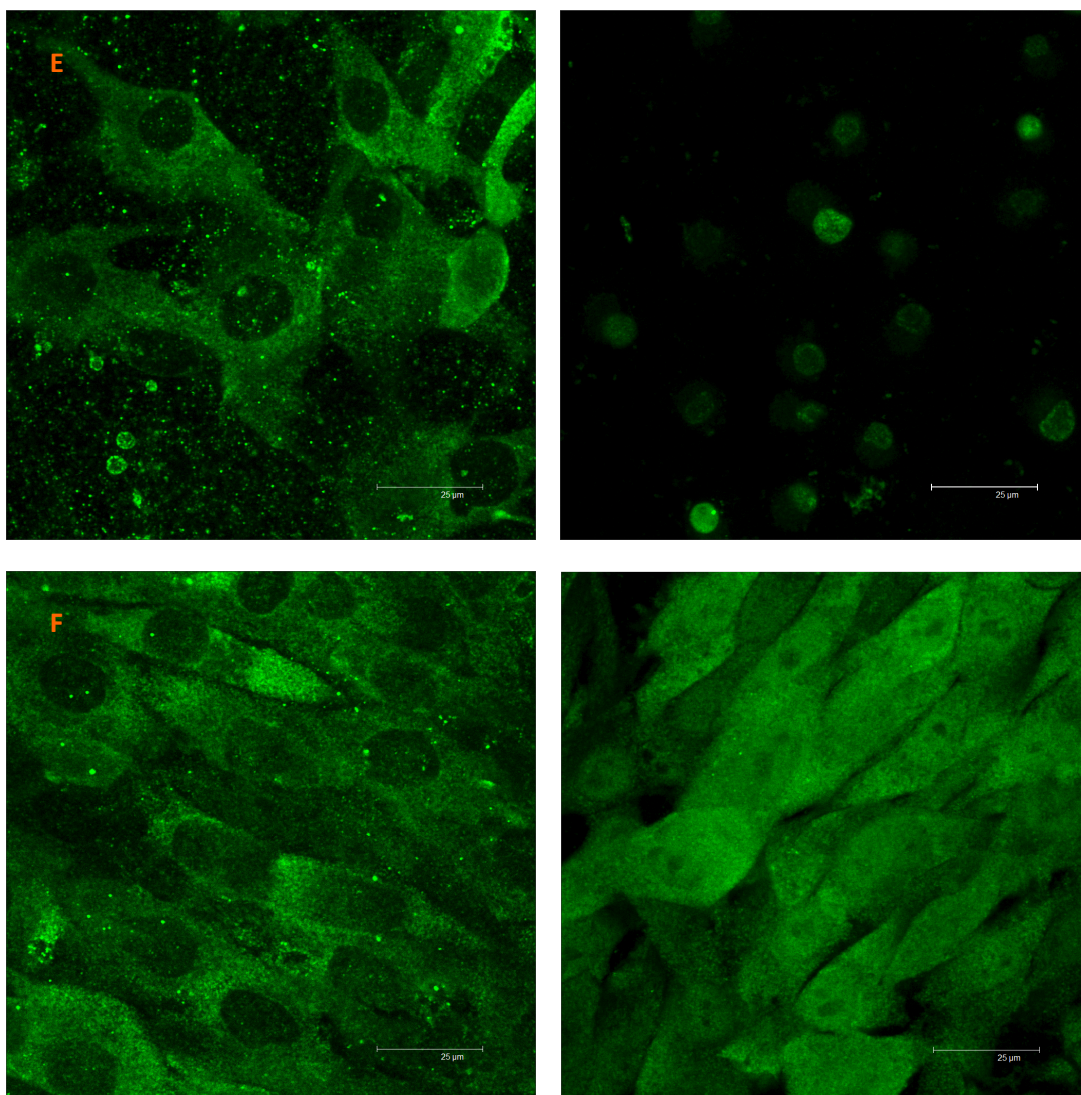
*Hodnoty jsou uvedeny v procentech [%] (průměr ± S.E.M.).

Příloha 10: **Imunofluorescenční barvení** - snímky

ALKALICKÁ FOSFATÁZA (ALP)

OSTEOKALCIN





Obr. P10.1 Snímky z konfokální mikroskopie. Imunofluorescenční barvení alkalické fosfatázy (ALP) a osteokalcinu lidských MG-63 buněk po 8 dnech kultivace na standardu (ST) a vzorcích nanovlákněných vzorcích elektrostaticky zvlákněných ze směsi PCL a kolagenu typu I (C, D, E, F). (Konfokální mikroskop Leica DMIRE2, obj. 20x. zoom 4x, měřítko = 25 μm.)